



**SEGUIMIENTO DE UN CULTIVO
DEL DINOFLAGELADO TÓXICO
OSTREOPSIS CF. OVATA,
PROCEDENTE DE UNA
PROLIFERACIÓN NATURAL EN
EL NOROESTE DEL
MEDITERRÁNEO**

Marina López Mor

Curso 2016/2017

Tutores:

Elisa Berdalet Andrés

Ricardo Jesús Haroun Tabraue

PROGRAMA DE MÁSTER OFICIAL EN GESTIÓN COSTERA

**Seguimiento de un cultivo del dinoflagelado tóxico
Ostreopsis cf. ovata, procedente de una proliferación
natural en el noroeste del Mediterráneo**

Trabajo realizado en el departamento de Biología Marina y Oceanografía del Instituto de Ciencias del Mar, bajo la dirección de la Dra. Elisa Berdalet Andrés.

Dentro del Proyecto OstreoRisk (CTM2014-53818-R), financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.

Autora: **Marina López Mor**

DNI:

Tutora: **Dra. Elisa Berdalet Andrés**

Vicedirectora del Instituto de Ciencias del Mar, Investigadora del Departamento de Biología Marina y Oceanografía

Tutor académico: **Dr. Ricardo J. Haroun Tabraue**

Catedrático de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

Barcelona, a 3 de julio de 2017

Tutora

Tutor académico

Autora

ÍNDICE

Lista de figuras	I
Lista de tablas	II
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Floraciones Algales Nocivas.....	2
1.2. Floraciones Algales Nocivas bentónicas.....	8
1.3. Características de <i>Ostreopsis</i> y <i>O. cf. ovata</i>	9
1.3.1. Morfología	12
1.3.2. Ciclo celular	15
1.3.3. Dinámica poblacional	17
1.3.4. Toxicidad - Palitoxina	19
1.3.5. Antecedentes: distribución y problemática	21
- Distribución global	21
- Mar Mediterráneo	23
- Sant Andreu de Llavaneres.....	26
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo general	29
2.2. Objetivos específicos.....	29
3. MATERIAL Y MÉTODOS	30
3.1. Protocolo de muestreo en la costa	30
3.2. Preparación de un cultivo <i>Ostreopsis cf. ovata</i>	32
3.3. Preparación de la muestra y conservación.....	35
3.4. Experimentos de fisiología en el laboratorio	36
3.5. Métodos de análisis de los parámetros estudiados	38
1. Recuento celular de <i>Ostreopsis</i>	38
- Método de Sedgewich-Rafter	40
2. Recuento de bacterias	44

- Método con membrana y epifluorescencia	44
3. Análisis de la clorofila	46
4. Volumen celular	47
- Alternativa al análisis manual: contador Coulter automatizado	49
5. Categorización celular de <i>Ostreopsis</i>	50
3.6. Instrumentos.....	52
3.6.1. Microscópico óptico	52
3.6.2. Microscopía de epifluorescencia	52
3.6.3. Análisis de datos	53
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
4.1. Experimento 1: Preparación técnicas de muestreo	56
4.2. Experimento 2: Preliminar.....	57
4.2.1. Seguimiento celular	59
4.2.2. Seguimiento bacteriano.....	61
4.2.3. Evolución de la concentración de clorofila	64
4.3. Experimento 3: Avanzado	66
4.3.1. Seguimiento celular	67
4.3.2. Seguimiento bacteriano	69
4.3.3. Evolución de la concentración de clorofila	71
4.3.4. Comparación del crecimiento de los experimentos 2 y 3	72
4.3.5. Comparación con los resultados <i>in situ</i>	75
4.3.6. Volumen celular	75
4.3.7. Comparación tamaño celular con resultados <i>in situ</i>	85
4.3.8. Categorización celular	87
4.3.9. Comparación morfológica con clasificación establecida	93
5. CONCLUSIONES	96
6. REFERENCIAS.....	99

Lista de figuras

Figura 1: Diferentes conceptos implicados en la ocurrencia de <i>HAB</i>	3
Figura 2: Transferencia de las biotoxinas a través de la cadena trófica.....	4
Figura 3: Dibujos de las 9 especies de <i>Ostreopsis</i>	11
Figura 4: Dibujo dinoflagelado teçado	13
Figura 5: Imágenes con microscopio electrónico de <i>O. cf. ovata</i>	14
Figura 6: Ciclo celular de los dinoflagelados, con todas las posibles transiciones descritas	16
Figura 7: Distribución global del género <i>Ostreopsis</i>	22
Figura 8: Conservación de los frascos de cultivo de especies bentónicas en la incubadora	34
Figura 9: Esquema de la técnica <i>scale up</i> , para la preparación del cultivo	34
Figura 10: Proceso de vertido de la muestra, fijada con lugol, en la cámara Sedgewick- Rafter	41
Figura 11: Esquema de recuento en la cámara Sedgewick-Rafter	43
Figura 12: Esquema del filtro con las bacterias	45
Figura 13: Dibujos de <i>Ostreopsis cf. ovata</i> con DV, W y AP señalados	48
Figura 14: Captura del programa ImageJ	49
Figura 15: Histograma experimento 1, <i>mixing experiment</i>	57
Figura 16: Evolución del número de células del experimento 2	60
Figura 17: Evolución de las medias de <i>Ostreopsis</i> del experimento 2	61
Figura 18: Evolución de la concentración de bacterias y número de células a lo largo del experimento 2	62
Figura 19: Red de mucus de <i>Ostreopsis cf. ovata</i> con microscopio óptico	63
Figura 20: Relación entre <i>Ostreopsis</i> y la clorofila del experimento 2	64
Figura 21: Cálculo de la tasa crecimiento a partir de la clorofila del experimento 2	65
Figura 22: Media de la clorofila por célula del experimento 2	65
Figura 23: Evolución del número de células del experimento 3	67
Figura 24: Evolución de las medias de <i>Ostreopsis</i> del experimento 3	68
Figura 25: Cálculo de la tasa de crecimiento a partir del número de células del experimento 3	69
Figura 26: Evolución de la concentración de bacterias y número de células a lo largo del experimento 3	70
Figura 27: Relación entre <i>Ostreopsis</i> y la clorofila del experimento 3	71
Figura 28: Media de la clorofila por célula del experimento 3.....	72
Figura 29: Comparación entre los experimentos 2 y 3	73

Figura 30: Diagrama de cajas de los diámetros dorsoventrales de células vegetativas del experimento 3	80
Figura 31: Diagrama de cajas de los transdiámetros de células vegetativas del experimento 3	81
Figura 32: Diagrama de cajas de las áreas de células vegetativas del experimento 3	82
Figura 33: Diagrama de cajas de los volúmenes de células vegetativas del experimento 3	83
Figura 34: Imágenes de <i>O. cf. ovata</i> en el t_2 , durante el inicio de la fase exponencial	88
Figura 35: Imágenes de <i>O. cf. ovata</i> en el t_7 , punto de inflexión dónde se inicia la fase estacionaria	89
Figura 36: Imágenes de <i>O. cf. ovata</i> en el t_{11} , durante el final de la fase estacionaria	90
Figura 37: Imágenes de células vegetativas perdiendo la teca	91
Figura 38: Imágenes de quistes de diferentes tamaños	92
Figura 39: Imagen a 40X de un quiste	92
Figura 40: Imágenes de células vegetativas con epifluorescencia a 40X	93

Lista de tablas

Tabla I: Descripción general de los efectos deletéreos causados por las floraciones de algas nocivas	6
Tabla II: Continuación de la descripción general de los efectos causados por las floraciones	7
Tabla III: Descripciones originales de las especies de <i>Ostreopsis</i>	10
Tabla IV: Características morfométricas de <i>Ostreopsis cf. ovata</i> recopiladas en distintas referencias	15
Tabla V: Estudios realizados sobre los impactos en la salud humana asociados a las proliferaciones de <i>Ostreopsis</i> en el mar Mediterráneo	26
Tabla VI: Instrumentos de recuento y su uso.....	40
Tabla VII: Relación entre el número de células contadas y el límite de confianza con un nivel de confianza del 95 %	42
Tabla VIII: Duración experimento 2	59
Tabla IX: Duración experimento 3	67
Tabla X: Características morfométricas de <i>O. cf. ovata</i> del experimento 3	77
Tabla XI: Características morfométricas de las células vegetativas de <i>O. cf. ovata</i> del experimento 3	78
Tabla XII: Resultados del test de la normalidad	79
Tabla XIII: Características morfométricas de los quistes del experimento 3	84
Tabla XIV: Presencia de quistes en el cultivo del experimento 3	85
Tabla XV: Resultados del diámetro dorsoventral medio en muestras naturales de <i>O. cf. ovata</i> en 2009	86

RESUMEN

Ostreopsis cf. ovata es un dinoflagelado bentónico tóxico que ha sido asociado con efectos dañinos sobre la salud humana y determinados organismos bentónicos. El género *Ostreopsis* está formado, de momento, por 9 especies ampliamente distribuidas en regiones tropicales y templadas a nivel mundial. Las proliferaciones de microalgas son procesos naturales, además de ser un componente clave de la estructura y dinámica de los ecosistemas acuáticos, aunque algunas especies pueden originar impactos negativos debido a la producción de toxinas. *Ostreopsis cf. ovata* puede sintetizar palitoxina y sus análogos. En el mar Mediterráneo, la proliferación de esta microalga está siendo un problema emergente asociado con problemas respiratorios e irritaciones cutáneas, incluso ha tenido repercusiones ecológicas como la mortalidad de erizos y mejillones. Por lo tanto, es importante desarrollar estudios en el laboratorio para caracterizar el comportamiento de las microalgas bentónicas nocivas o tóxicas. En este trabajo se caracterizan las formas celulares relacionadas con su ciclo de vida y ciertos parámetros relacionados con la biomasa (número de células, clorofila) en función del estado fisiológico del cultivo de *O. cf. ovata*, aislado a partir de una proliferación natural acaecida en el noroeste del Mediterráneo. La limitación más importante al trabajar con esta microalga es la producción de mucílago, una estructura compleja de fibras orgánicas que agregan gran cantidad de células, también se observa la relación de las bacterias con la microalga gracias al mucílago. Con los parámetros estudiados se calcula la tasa de crecimiento de los cultivos de los experimentos y se compara con muestras de campo del mismo origen del cultivo (Sant Andreu de Llavaneres, Cataluña), resultando ser la tasa de crecimiento de la proliferación natural ligeramente menor, probablemente debido a las pérdidas de células por dispersión debido al movimiento del agua o por la depredación. Además, se estudia la morfología y morfometría de las células de *O. cf. ovata*, para poder comprender la variabilidad de las formas de vida observadas en el medio natural. Los conocimientos adquiridos permiten mejorar tanto el monitoreo como la prevención de los impactos negativos de las proliferaciones de *Ostreopsis*.

Palabras clave: *Ostreopsis cf. ovata*, proliferaciones algales nocivas, cultivos de laboratorio, morfología celular.

ABSTRACT

Ostreopsis cf. ovata is a toxic benthic dinoflagellate, which has been associated with harmful effects on human health and certain benthic organisms. The genus *Ostreopsis* includes so far nine species largely distributed in tropical and temperate regions worldwide. Microalgae blooms are natural processes and a key component of the structure and dynamics of the oceans. However, some species can cause negative impacts because they produce toxins. *Ostreopsis cf. ovata* can synthesize palytoxin and their analogues. In the Mediterranean Sea, the proliferation of this microalgae constitutes an emergent problem related to respiratory and skin irritations, moreover it has ecological problems like urchin and mussel's massive mortalities. Therefore, it is important to conduct studies in the lab to characterise the behaviour of the benthonic microalgae and understand their dynamics in natural conditions. In this study, the cell forms and biomass related parameters (cells number, chlorophyll) were characterized along different physiological phases of an *O. cf. ovata* culture. The cells were isolated from field samples taken in the north-western Mediterranean coast. The most important limitation when working with this species is the mucilage production, a complex structure of organic fibres, produced by *Ostreopsis* to attach to surfaces and which aggregates a large number of cells. Moreover, the relationship between bacteria and microalgae was also analysed. The growth rate is calculated from the studied parameters and it is compared with field samples along a natural bloom in the same site where the cells were isolated (Sant Andreu de Llavaneres, Catalonia). The natural bloom has a growth rate slightly lower than the culture, likely due to higher cell losses associated to dispersion by water motion and to grazing pressure. Furthermore, the morphology and morphometry of the *O. cf. ovata* cells to be able to understand the variability observed in nature. The gained understanding contributed to a better monitoring and prevention of the impacts of *Ostreopsis*.

Keywords: *Ostreopsis cf. ovata*, harmful algae bloom, laboratory culture, cell morphology.

1. INTRODUCCIÓN

En este trabajo se quiere caracterizar el crecimiento de un cultivo de *Ostreopsis* cf. *ovata*, utilizando parámetros celulares y bioquímicos. Es de gran importancia tener un conocimiento amplio sobre el comportamiento de las microalgas que proliferan en nuestras costas e intervienen tanto en los ecosistemas naturales como en las actividades humanas. *Ostreopsis* cf. *ovata* es un dinoflagelado tóxico, implicado en las proliferaciones nocivas de las costas mediterráneas pudiendo llegar a ser perjudicial.

Los experimentos analizados para este TFM están dentro del proyecto OstreoRisk, realizados por la Dra. Elisa Berdalet y el Dr. David J. Kieber durante el verano de 2016. El objetivo general de los experimentos es caracterizar un cultivo de *O. cf. ovata* en condiciones controladas. De este modo, se tendrá más información para caracterizar y comprender mejor cómo se comporta esta especie en el medio marino natural. Para ello, es preciso estudiar los parámetros fisiológicos, así como la producción de toxina y dimetilsulfoniopropionato (DMSP).

En este trabajo se exponen los datos obtenidos de la parte fisiológica, mientras que el análisis del DMSP está siendo realizado por el Dr. Kieber en Nueva York y las toxinas se analizarán en la Universidad de Barcelona. Tanto la parte fisiológica como la analítica son complementarias para poder avanzar en el conocimiento de los dinoflagelados bentónicos, en especial para esta especie de microalga.

Antes de entrar en la descripción del estudio realizado y exponer los datos obtenidos del seguimiento del cultivo, se presenta brevemente la problemática de las proliferaciones nocivas de microalgas y en concreto de las producidas por el género *Ostreopsis*.

1.1. Floraciones Algales Nocivas

La base de las redes tróficas marinas está constituida por organismos fotosintetizadores de pequeño tamaño (los micrófitos), tales como las microalgas bentónicas, las microalgas planctónicas y las cianobacterias. Estos organismos se caracterizan por ser fijadores de carbono y por producir oxígeno, además son abundantes y ubicuos en todos los mares, océanos y aguas salobres (Berdalet *et al.*, 2016). Por lo tanto, son considerados componentes clave de la estructura y dinámica de los océanos.

Cuando se habla de “proliferaciones (floraciones o *blooms*, en inglés) de microalgas nocivas” o “mareas rojas” se trata de fenómenos naturales que los humanos perciben como dañinos para su salud o la de los ecosistemas (Glibert & Pitcher, 2001). Es decir, las proliferaciones de microalgas tienen ciclos estacionales y, generalmente, forman parte de los ecosistemas de manera natural. Son resultado de una combinación de mecanismos e interacciones físicas, químicas y biológicas, muchas veces poco conocidas y en las que aún queda mucho por explorar sobre sus causas. Pero también pueden estar influenciadas por la acción antropogénica, en especial las actividades desarrolladas en las zonas costeras. Concretamente, la eutrofización por aportes de nutrientes y la construcción de puertos (que favorecen zonas de acumulación de algas) y la destrucción del hábitat natural, o el calentamiento global.

Entre el sector científico, es común llamarlas; **Floraciones Algales Nocivas** (FAN) o en inglés *Harmful Algal Blooms* (HABs). Existen especies no tóxicas que causan *blooms* de tan altas densidades, que terminan provocando la muerte de peces e invertebrados, debido a la disminución de oxígeno como consecuencia de la degradación de la carga orgánica. Otras especies de microalgas son productoras de toxinas, que son introducidas en la red alimentaria causando problemas gastrointestinales y enfermedades neurológicas. De este modo, los HABs son considerados una amenaza para la salud pública, a lo que hay que añadir, grandes pérdidas económicas en la industria pesquera y en el turismo

(Berdalet *et al.*, 2016), tal y como se muestra en la figura 1. Las floraciones se producen en todos los ambientes acuáticos, ya sea agua dulce, salobre o marina, y a cualquier latitud. Cuando se dan estos eventos, los recursos costeros se contaminan y consecuentemente, los residentes de la zona cercana y otros agentes implicados se ven altamente perjudicados. Los mares y océanos proporcionan al ser humano muchos beneficios, ya que se obtienen alimentos, se desarrollan actividades económicas como el turismo, el ocio y actividades recreativas, y se podrían ver afectados.

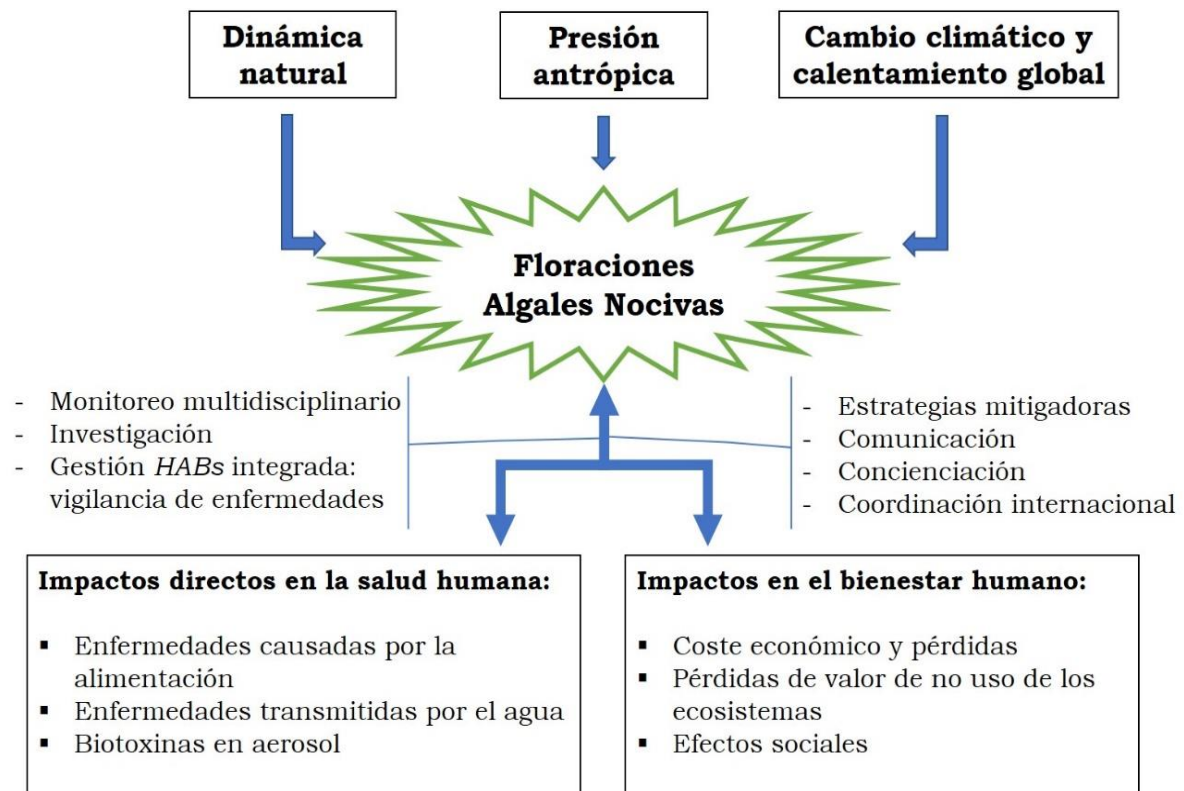


Figura 1: Diferentes conceptos implicados en la ocurrencia de *HAB*. Basado en el artículo de Berdalet *et al.* 2016.

Estos fenómenos provocan **intoxicaciones** en muchos organismos, causando distintos síntomas a los afectados; desde la mortandad masiva de peces, la contaminación de los moluscos y crustáceos por las toxinas, hasta la alteración negativa de los ecosistemas (Shears & Ross, 2009; Amzil *et al.*, 2012; Brissard *et al.* 2014).

La intoxicación en humanos puede estar provocada por la ingestión de peces, bivalvos y en general productos del mar contaminados, mediante contacto

cutáneo con agua contaminada por toxinas y también, por la inhalación de toxinas aerosolizadas u otros componentes nocivos (Berdalet *et al.*, 2016).

En las intoxicaciones por ingestión, puede darse el caso de que algunas de las toxinas generadas por las microalgas, se vayan bioacumulando en los distintos vectores marinos. Se ha notificado la bioacumulación de compuestos de tipo palitoxina en moluscos bivalvos y equinodermos herbívoros (Aligizaki *et al.*, 2011; Amzil *et al.*, 2012; Brissard *et al.*, 2014). Muchas veces estos vectores no presentan problemas aparentes, hasta que se transfieren a los humanos (de los últimos organismos de la cadena trófica, tal y como se muestra en la fig. 2). Los individuos al ingerir peces que se alimentan del fondo, moluscos, crustáceo e incluso otros organismos infectados, están incorporando las toxinas a través de ellos. Otro aspecto desfavorable es la resistencia que presentan gran parte de las toxinas neurotóxicas a la temperatura (se mantienen estables), por lo que al cocinarlas siguen estando activas y es un peligro consumir los organismos contaminados (Hallegraeff, 1995).

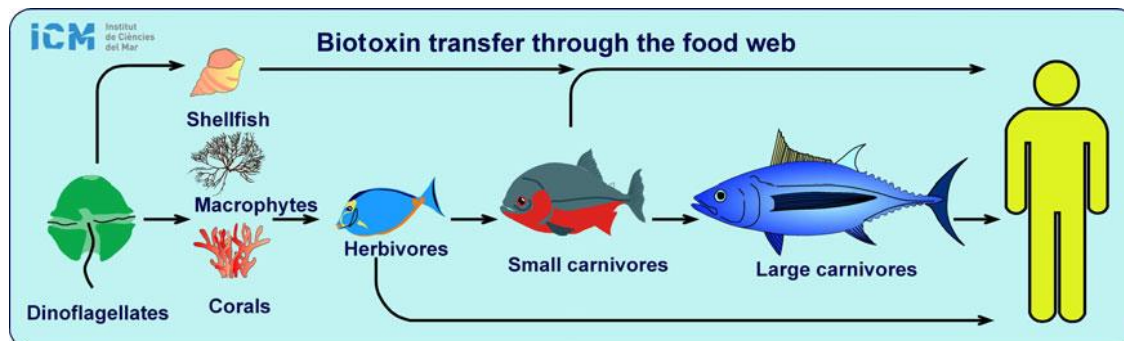


Figura 2: Transferencia de las biotoxinas a través de la cadena trófica. Las toxinas producidas por los dinoflagelados se bioacumulan en organismos filtradores que aparentemente no son afectados, el consumo directo de estos mariscos produce problemas. Las especies tóxicas se adhieren a superficies como los corales o macrófitas mediante mucílago. Partes de las macroalgas y corales recubiertas de la microalga se introducen a la cadena trófica por los peces herbívoros. Fuente: Berdalet *et al.* (2016).

De las miles de especies de microalgas descritas por el momento, cerca de 300 están involucradas en eventos dañinos y alrededor de 200 especies son consideradas productoras de toxinas potentes y persistentes, que pueden ser dañinas e incluso provocar efectos deletéreos en humanos y animales (Moestrup *et al.*, 2009). El grupo de los dinoflagelados (Dinophyceae) incluye el mayor

número de especies tóxicas, aproximadamente el 75%. Otros grupos con especies generadoras de toxinas son las rafidofíceas, primnesiofíceas y dictiocofíceas. Unas pocas diatomeas también son tóxicas (género *Pseudo-nitzschia*).

Los **impactos directos** que provocan las floraciones algales nocivas conocidas por el momento, se manifiestan y se conocen según las causas ocasionadas en los diferentes ámbitos como son la salud humana, los recursos marinos, el turismo y las actividades recreativas y en general, la afectación del ecosistema marino. Los efectos causados por las proliferaciones de algas nocivas se encuentran recogidos en las tablas I y II a modo de resumen, extraídas del *Science Plan* elaborado por GEOHAB en 2001, basado en Zingone & Enevoldsen (2000).

Destacar que un mismo evento puede repercutir con varios efectos negativos sobre el medio. De aquí surge la importancia de estudiar estos fenómenos y caracterizar las diferentes especies que provocan *blooms* de microalgas dañinas, además de la evolución de las especies en su redistribución geográfica.

En las últimas décadas, muchas microalgas tropicales están siendo encontradas en zonas templadas debido al cambio climático y las variaciones producidas en los océanos (Rhodes, 2011). Estos cambios en el estado de los océanos pueden estar relacionados, entre otros factores, con determinadas actividades humanas (que se aportan nutrientes en las zonas costeras: eutrofización) o mediante el transporte y descarga de agua de lastre, lo que provocan que la situación empeore.

Efectos	Organismos causantes (algunos ejemplos)		Toxina causante
Salud humana			
Intoxicación por veneno paralítico al consumir marisco (PSP)	Dinoflagelados	<i>Alexandrium</i> spp., <i>Pyrodinium bahamense</i> var. <i>compressum</i> , <i>Gymnodinium catenatum</i>	Saxitoxina y sus derivados
	Cianobacterias	<i>Anabaena circinalis</i>	
Intoxicación por veneno diarreico al consumir marisco (DSP)	Dinoflagelados	<i>Dinophysis</i> spp., <i>Prorocentrum</i> spp.	Ácido ocadaico y sus derivados
Intoxicación neurotóxica o neurológica por consumo de marisco (NSP)	Dinoflagelados	<i>Karenia brevis</i>	Brevetoxinas
Intoxicación por amnésico de moluscos (ASP)	Diatomeas	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp., <i>Nitzschia navis-varingica</i>	Ácido domoico y sus isómeros
Intoxicación por azaspirácidos en moluscos (AZP)	Dinoflagelados	<i>Amphidoma lánguida</i> , <i>Azadinium</i> spp.	Azaspirácidos y sus derivados
Ciguatera (CFP)	Dinoflagelados	<i>Gambierdiscus toxicus</i>	Ciguatoxina
Hepatotoxicidad	Cianobacterias	<i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Nodularia spumigena</i>	Cianotoxinas
Palitoxicosis	Dinoflagelados	<i>Ostreopsis</i> spp.	Palitoxina, Ovatoxina, Ostreocin
Problemas respiratorios, irritación de piel y efectos neurológicos	Dinoflagelados	<i>Karenia brevis</i> , <i>Pfiesteria piscicida</i>	
	Cianobacterias	<i>Nodularia spumigena</i>	

Tabla I: Descripción general de los efectos deletéreos causados por las floraciones de algas nocivas. PSP, *Paralytic Shellfish Poisoning*; DSP, *Diarrhetic Shellfish Poisoning*; NSP, *Neurotoxic Shellfish Poisoning*; ASP, *Amnesic Shellfish Poisoning*; AZP, *Azaspiracid Shellfish Poisoning*; CFP, *Ciguatera Fish Poisoning*. Fuentes: Glibert & Pitcher (GEOHAB) 2001, modificado de Zingone & Enevoldsen 2000 y complementado con Berdalet *et al.* 2016.

Efectos	Organismos causantes (algunos ejemplos)	
Recursos marinos (naturales y cultivados)		
Efectos hemolíticos, hepatotóxicos, osmorreguladores...	Dinoflagelados	<i>Gymnodinium</i> spp., <i>Cochlodinium polykrikoides</i>
	Rafidofíceas	<i>Heterosigma akashiwo</i> , <i>Fibrocapsa japonica</i>
	Primnesiofíceas	<i>Chrysochromulina</i> spp., <i>Prymnesium</i> spp.
	Cianobacterias	<i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Nodularia</i> spp.
Efectos negativos en el comportamiento alimentario	Pelagofíceas	<i>Aureococcus anophagefferens</i>
Hipoxia, anoxia	Dinoflagelados	<i>Prorocentrum micans</i> , <i>Ceratium fuca</i>
Daños mecánicos	Diatomeas	<i>Chaetoceros</i> spp.
Obstrucción de las branquias y necrosis	Primnesiofíceas	<i>Phaeocystis</i> spp.
Turismo y actividades recreativas		
Producción de espuma, mucílago, decoloración y mala olor	Dinoflagelados	<i>Nocticula scintillans</i> ,
	Primnesiofíceas	<i>Prorocentrum</i> spp.
	Diatomeas	<i>Phaeocystis</i> spp.
	Cianobacterias	<i>Cylindrotheca closterium</i> <i>Nodularia spumigena</i>
Impactos en los ecosistemas marinos		
Hipoxia, anoxia	Dinoflagelados	<i>Nocticula scintillans</i>
	Diatomeas	<i>Skeletonema costatum</i>
	Primnesiofíceas	<i>Phaeocystis</i> spp.
Efectos negativos en el comportamiento alimentario organismos acuicultura	Pelagofíceas	<i>Aureococcus anophagefferens</i> , <i>Aureobra lagunensis</i>
Aumento de la turbidez	Dinoflagelados	<i>Prorocentrum minimum</i>
Toxicidad de la fauna marina salvaje	Dinoflagelados	<i>Karenia brevis</i> , <i>Alexandrium</i> spp.
	Diatomeas	<i>Pseudo-nitzschia australis</i>

Tabla II: Continuación de la descripción general de los efectos causados por las floraciones.
Fuente: Glibert & Pitcher (GEOHAB) 2001, modificado de Zingone & Enevoldsen 2000.

En resumen, los *HABs* están ampliamente distribuidos y cada vez se dan más frecuentemente. Son atribuidos a extensas problemáticas sobre la salud humana, ya que algunas toxinas se van bioconcentrando en los organismos y en el medio, introducidas en la red alimentaria (como se apreció en la figura 2). Por lo tanto, desde una perspectiva humana son considerados eventos negativos que generan pérdidas económicas directas.

La limitación actual del conocimiento que existe al describir los factores que controlan y que generan estas proliferaciones, hace que hoy en día se pongan esfuerzos en su investigación. Los estudios científicos tienen la finalidad de entender las características fisiológicas, morfológicas y de comportamiento de las microalgas que provocan las *HABs* y cómo éstas interaccionan en diferentes condiciones ambientales.

1.2. Floraciones Algales Nocivas bentónicas

La mayoría de los estudios realizados hasta el momento están enfocados a los *blooms* de ecología planctónica, no a los de tipo bentónico. Las proliferaciones nocivas asociadas a algas bentónicas son conocidas como *Benthic Harmful Algal Blooms* (*BHABs*). Las especies causantes de estos fenómenos se encuentran predominantemente adheridas en las macroalgas de los arrecifes de coral y en sustratos rocosos de aguas tropicales. Aunque algunos géneros también están ampliamente distribuidos sobre macroalgas y sustratos rocosos en zonas costeras de aguas cálidas y también durante el verano en zonas templadas, ya que son ambientes favorables para los *BHABs*.

El estudio de los dinoflagelados bentónicos empezó a finales del 1970, al descubrir que algunas especies bentónicas provocaban la ciguatera. Esta intoxicación humana transmitida por la alimentación de peces contaminados está provocada por el dinoflagelado tóxico *Gambierdiscus*. En las últimas décadas, se han asociado proliferaciones a muchas de las enfermedades que desarrollan la fauna y los humanos (Parsons *et al.*, 2012). Otro género de dinoflagelado bentónico problemático es *Ostreopsis*, algunas especies son productoras de

palitoxinas, son vasoconstrictoras en mamíferos (Rhodes *et al.*, 2002; Tichadou *et al.*, 2010), también están vinculadas a irritaciones cutáneas de bañistas (Deeds & Schwartz, 2010) y causan problemas respiratorios (Ciminiello *et al.*, 2008; Vila *et al.*, 2008, 2012, 2016). De manera que los *blooms* de microalgas nocivas bentónicas pueden causar problemas serios al medio ambiente y a la salud humana.

Como se ha dicho anteriormente, gran parte de los trabajos estudian los *HABs* que hacen referencia a ciclos planctónicos, así que las proliferaciones bentónicas son menos conocidas. Existen evidencias claras que diferencian la ecología de los dinoflagelados planctónicos con los bentónicos, ya que los primeros dependen de un cuerpo de agua, en cambio los bentónicos dependen de un sustrato. Las formas bentónicas son principalmente epífitas y tienden a ser más planas que las que son planctónicas. Al ser aplanadas, la relación superficie/volumen es mayor que en células esféricas por lo que esta forma ayuda a la absorción de nutrientes bajo condiciones oligotróficas (Fraga *et al.*, 2012).

El presente trabajo se centra en las proliferaciones producidas por el género *Ostreopsis*, en concreto de la especie *O. cf. ovata*.

1.3. Características de *Ostreopsis* y *O. cf. ovata*

Ostreopsis Schmidt es uno de los dos géneros (el otro es *Coolia* Meunier) que constituyen la familia de Ostreopsidaceae (Gonyaulacales, Dinophyceae, Dinoflagellata). Este género está compuesto únicamente por especies fotosintetizadoras, es decir que se encargan de fijar la materia orgánica a través de la energía lumínica. Se trata de un género fundamentalmente béntico, ya que se han observado en diferentes hábitats siempre cercanos al fondo del mar, aunque, algunos especímenes también se han encontrado en la columna de agua (Faust *et al.*, 1996). Estos dinoflagelados son epífitos, viven sobre superficies arenosas, corales, macroalgas y manglares (Faust *et al.*, 1996; Aligizaki & Nikolaidis, 2006; Laza-Martinez *et al.*, 2011), a menudo en conjunto con otras microalgas bentónicas similares, tales como *Coolia monotis*, *Prorocentrum lima* y *Coscinodiscus* sp. (Vila *et al.*, 2012).

Hasta ahora, se han descrito 9 especies: *O. siamensis* Schmidt (1902), *O. ovata* Fukuyo y *O. lenticularis* Fukuyo (1981), *O. heptagona* Norris (1985), *O. mascarenensis* Quod (1994), *O. labens* Faust & Morton (1995), *O. marinus* Faust, *O. belizeanus* Faust y *O. caribbeanus* Faust (1999), tal y como se muestra en la tabla III y figura 3. Recientemente, se han encontrado dos especies nuevas, *O. rhodesae* Hoppenrath & Murray (2016) y *O. fattorussoi* Accoroni (2016) aceptadas por *AlgaeBase*.

Species	Author (s)	Type locality	Toxicity
<i>O. siamensis</i>	Schmidt (1902)	Gulf of Siam.	Yes? ^a
<i>O. lenticularis</i>	Fukuyo (1981)	Ora Tahiti insula, French Polynesia	Yes? ^a
<i>O. ovata</i>	Fukuyo (1981)	Ora Ryukyu insulae, Japan	Yes? ^a
<i>O. heptagona</i>	Norris et al. (1985)	Florida Keys	Yes? ^b
<i>O. labens</i>	Faust and Morton (1995)	Belize	Unknown
<i>O. marinus</i>	Faust (1999)	Belize	Unknown
<i>O. belizeanus</i>	Faust (1999)	Belize	Unknown
<i>O. caribbeanus</i>	Faust (1999)	Puerto Rico	Unknown
<i>O. mascarenensis</i>	Quod (1994)	Indian Ocean	Yes
<i>O. cf. ovata</i>	-	Atlantic, Mediterranean, Indo-Pacific	Yes
<i>O. cf. siamensis</i>	-	Mediterranean-Atlantic	Yes
<i>Ostreopsis</i> sp. Lanzarote type	-	East Mediterranean, Canary Islands Mediterranean Sea	Yes ^c
<i>O. lenticularis</i> (?)		Pulau Redang, Malaysia, South China Sea	?
<i>O. labens</i> (?)		Pacific, Malaysia	?

Tabla III: Descripciones originales de las especies de *Ostreopsis*. a No hay datos de la localidad; b Toxicidad limitada presentada en bioensayos con ratones (Norris et al., 1985); c Cepas de Creta y Chipre. Fuente: Parsons *et al.* (2012).

Todas las especies están descritas en base a las diversas características morfológicas de las células, a partir de muestras de campo. Tales características discriminatorias incluyen: el tamaño de la célula, su longitud dorsoventral (DV), la longitud transversal (W), la longitud anteroposterior (AP), la relación entre la DV y W, la relación DV con AP, la longitud de las placas y su estructura, el tamaño de los poros de la teca, la forma y los patrones de las placas (Fukuyo, 1981; Norris *et al.*, 1985; Quod, 1994; Faust *et al.*, 1996; Penna *et al.*, 2005). Por lo tanto, la taxonomía y caracterización de una especie se determina con los parámetros citados anteriormente.

La clasificación de los dinoflagelados va cambiando y es difícil establecer unos criterios inamovibles, ya que se van descubriendo nuevas especies y géneros, por

lo que van surgiendo reordenamientos de las entidades sistemáticas y taxonómicas. Nuestro género a estudiar también presenta alguna dificultad a la hora de clasificarse taxonómicamente.

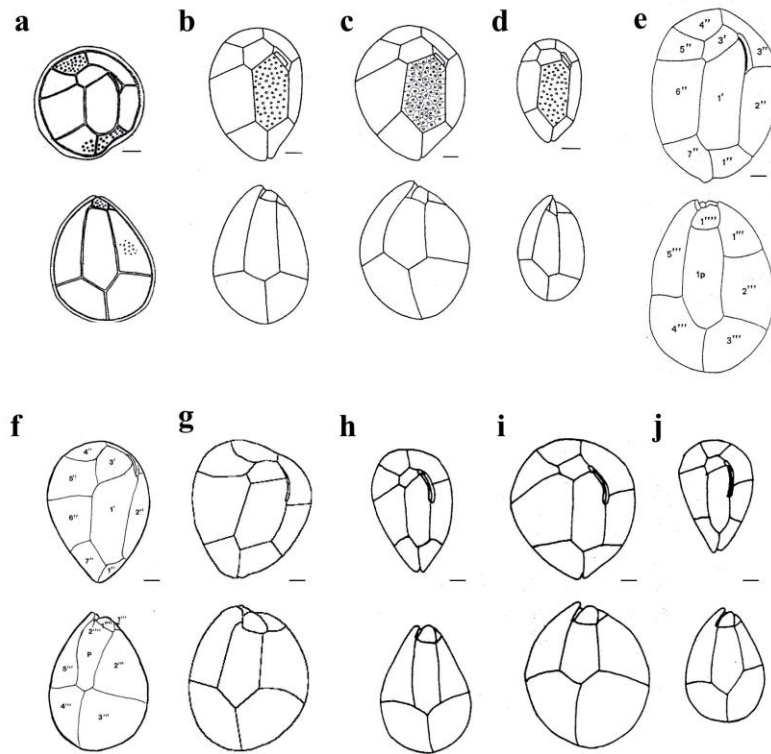


Figura 3: Dibujos de las 9 especies de *Ostreopsis*. Vista de la epiteca (dibujo superior) y vista de la hipoteca (dibujo inferior). (a) *Ostreopsis siamensis* (Schmidt 2001), (b) *O. siamensis* (Steidinger & Tangen 1996), (c) *O. lenticularis*, (d) *O. ovata*, (e) *O. mascarenensis*, (f) *O. heptagona*, (g) *O. labens*, (h) *O. belizeanus*, (i) *O. marinus*, (j) *O. caribbeanus*. Escala de las barras= 10 μ m. Fuente: Penna *et al.* (2005).

Ha surgido cierta confusión al describir y diferenciar correctamente las distintas especies de *Ostreopsis* spp., especialmente *O. siamensis* y *O. lenticularis*, ya que tienen tamaños similares pero la disposición de los poros de la teca es distinta (Fukuyo, 1981), aunque Faust *et al.* (1996) encontró que la primera especie era más grande. Por otro lado, Vila *et al.* (2001b) descubrió que las células halladas en el noroeste del Mediterráneo coincidían con la descripción de *O. siamensis* según Fukuyo (1981), pero no con la de Faust *et al.* (1996). Asimismo, el tamaño de poro sí que coincidía con la descripción de *O. ovata* hecha por Faust *et al.* (1996). *O. ovata* se distinguió de las otras dos especies por tener una forma más ovoide y un tamaño más pequeño (Parsons *et al.*, 2012). Ha habido mucho debate sobre la

taxonomía de *O. ovata*, ya que se han encontrado cepas en varios lugares, la variación intraespecífica entre las cepas es considerable y el rango de tamaños es muy amplio. Por el contrario, hay relativamente poca variación de la forma y de los patrones de las placas entre las cepas. Además, como los artículos con caracterización genética son escasos, algunos estudios han nombrado a las cepas de *O. ovata* como *O. cf. ovata*, haciendo uso del cónfer. Por lo tanto, se necesitan más estudios sobre las características morfológicas y genéticas de mayor número de cepas (Kang *et al.*, 2013).

A continuación, se ofrece una descripción simplificada del género a estudiar, *Ostreopsis*, y en concreto de la especie de interés, *Ostreopsis cf. ovata*. Se explican las características morfológicas, el ciclo celular, la dinámica poblacional, la toxicidad, además de su distribución y problemáticas que ha generado.

1.3.1. Morfología

Las especies de *Ostreopsis* son dinoflagelados tecados (con pared celular). Sus células están aplanadas y tienen forma ovalada. La morfología externa de las células vegetativas y de las formas de resistencia (quistes o *cyst* en inglés) es variante, las estructuras de la pared presentan distintas características.

La teca está compuesta primariamente de celulosa, su estructura está formada por placas grandes y varias plaquetas. La placa situada en la parte anterior o apical recibe el nombre de **epiteca** y la que se localiza en la parte posterior o antapical se conoce como **hipoteca**. El **cíngulo o cingulum** está comprendido entre estas dos placas, y es dónde se encuentra uno de los flagelos. El cíngulo es un surco transversal estrecho, profundo y casi circular, de bordes suaves. Además, tiene dos estructuras convexas situadas ventralmente, una placa ventral con un poro ventral y una cresta (Selina & Orlova, 2010). En la hipoteca, justo en la parte ventral se encuentra el **sulco** con el otro apéndice, el flagelo longitudinal. Este surco longitudinal es una ranura pequeña, comprendida entre las dos placas antapicales. El lado de la célula con el sulco, es la parte **ventral**. El lado opuesto es la parte **dorsal**. Además, también se puede distinguir entre el lado lateral

izquierdo y el derecho. Las células con teca pueden tener un **poro apical** (APC) situado en la epiteca, normalmente a un lado (Hoppenrath *et al.*, 2014). El ápice o complejo del poro apical es extremadamente excéntrico y asimétrico, se sitúa en la dorsal izquierda de la epiteca. Consiste en una ranura alargada, circular o rectangular en la placa. Todos estos conceptos se ven representados en la figura 4 de un dinoflagelado tecado hecho por Mona Hoppenrath.

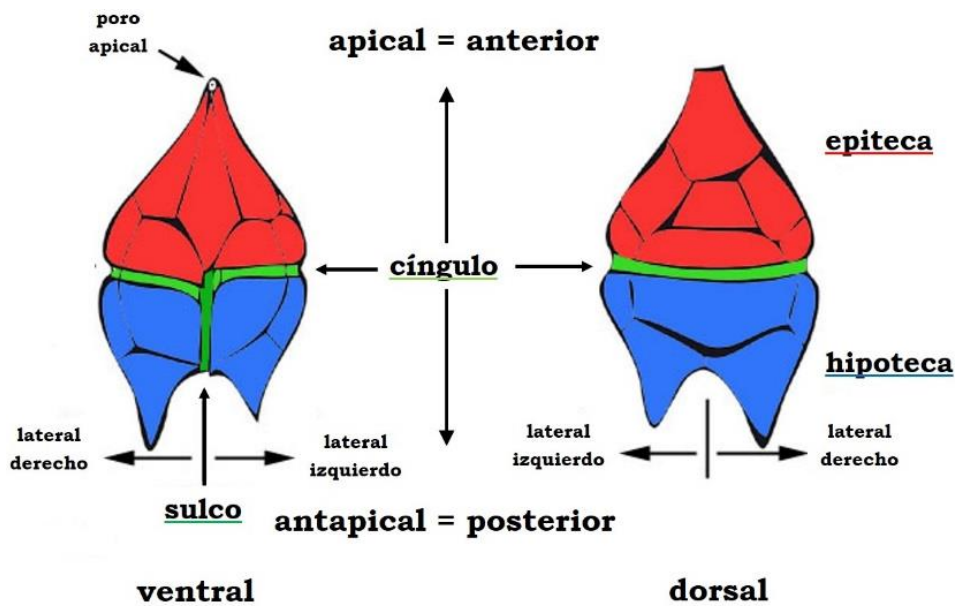


Figura 4: Dibujo dinoflagelado tecado. Fuente: Hoppenrath (*Orientation of a Motile Dinoflagellate Cell*), Tree of Life web Project: tolweb.org/articles/?article_id=4756

En el caso de *Ostreopsis* cf. *ovata* las células se aproximan a la forma geométrica de un elipsoide, también se podría comparar a una almendra o a una lágrima. Las células están intensamente comprimidas desde una orientación anteroposterior, tal y como se puede ver en las imágenes de la figura 5, tomadas por Kang *et al.* (2013). Tanto la epiteca como la hipoteca son iguales de tamaño, y acostumbran a observarse desde la vista apical o antapical. La distribución de las placas y su estructura viene descrita por unos códigos (tabulación de Kofoid) como por ejemplo: Po, 3', 7'', 6c, 6s, V_p, R_p, 5''', 1p, y 2'''' (descripción de la célula de la fotografía de Korea (Kang *et al.*, 2013).

Contrariamente, la teca de los dinoflagelados acostumbra a estar muy comprimida lateralmente (como en la figura 4), diferente al género *Ostreopsis*.

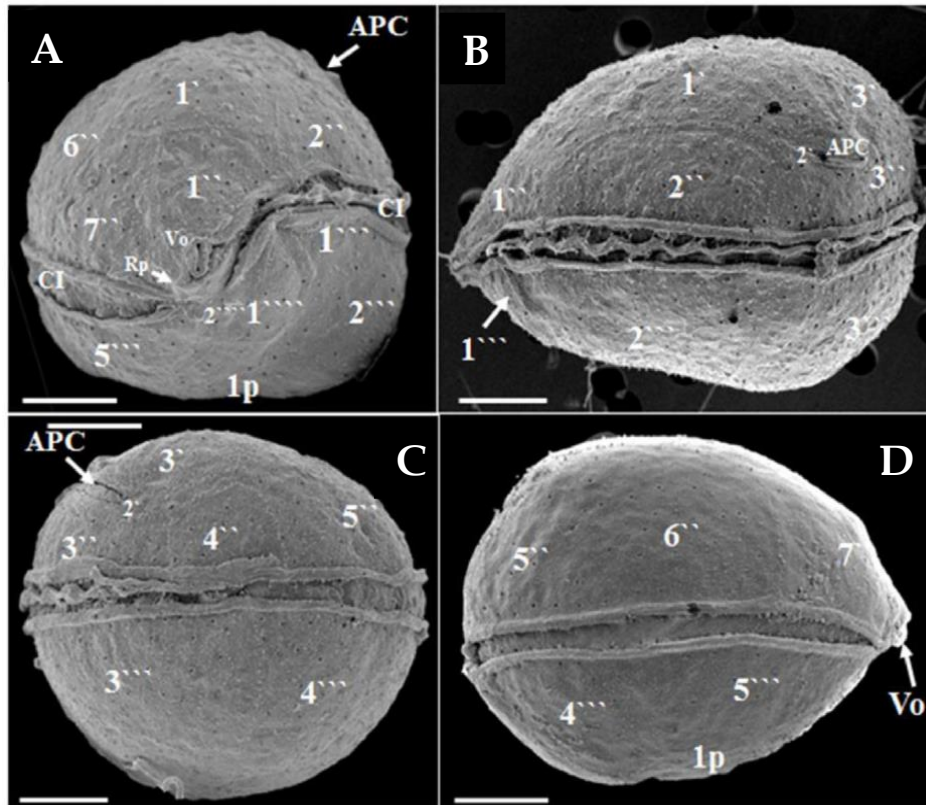


Figura 5: Imágenes con microscopio electrónico de *O. cf. ovata*. (A) Vista ventral de la epiteca e hipoteca; CI, cíngulo; Vo, apertura ventral; Rp, placa crestada y APC complejo del poro apical. (B) Vista lateral dorsal-izquierda de la epiteca, hipoteca y APC. (C) Vista dorsal de la epiteca e hipoteca. (D) Vista lateral derecha de la epiteca e hipoteca. Escala de las barras= 5 μ m. Fuente: Kang *et al.* (2013).

Por lo que hace referencia al tamaño de las células de *O. cf. ovata*, existen distintos estudios con resultados semejantes. El tamaño celular se describe con el diámetro dorsoventral (DV), equivalente a la longitud de la célula, el transdiámetro (W), equivalente a la anchura, y el diámetro anteroposterior (AP), equivalente a la profundidad, representado como la relación entre DV/AP. La tabla IV muestra las dimensiones de las células de *Ostreopsis cf. ovata* de diferentes estudios. También existen otras referencias dónde se pueden encontrar tamaños celulares de *Ostreopsis ovata* (Fukuyo, 1981; Tognetto *et al.*, 1995; Faust *et al.*, 1996; Penna *et al.*, 2005; Aligizaki & Nikolaidis, 2006; Guerrini *et al.*, 2010; entre otros).

DV (μm)	W (μm)	DV/AP	Tipo de muestra	Referencia
30 – 71	18 – 53	2.4 \pm 0.4	Población natural del NO mar Adriático	Monti <i>et al.</i> (2007)
36 – 60	24 – 45	2.1	Población natural del mar de Japón	Selina & Orlova (2010)
48 – 65	31 – 46	ND	Población natural del NO mar Adriático	Honsell <i>et al.</i> (2011)
19 – 75	13 – 60	2.31 \pm 0.37	Población natural del NE mar Adriático	Accoroni <i>et al.</i> (2012a)
27 – 85	17 – 65	ND	Cultivos a partir de población natural del NE España y de Croacia	Bravo <i>et al.</i> (2012)
21 – 77	16 – 51	ND	Población natural del NO mar Mediterráneo	Carnicer <i>et al.</i> (2015)

Tabla IV: Características morfométricas de *Ostreopsis cf. ovata* recopiladas en distintas referencias. ND, No hay datos; DV, diámetro dorsoventral; W, transdiámetro; AP, diámetro anteroposterior; DV/AP valores medios.

Las células de *O. cf. ovata* y *O. fattorussoi* son consideradas de las más pequeñas dentro del género. Las especies *O. siamensis* y *O. ovata* son muy similares en forma y dimensiones, tal y como se ha comentado con anterioridad, por lo que una característica distintiva es la relación entre DV/AP. Para *O. siamensis* esta relación es mayor (>4) y para *O. ovata* es menor (<2) (Penna *et al.*, 2005; Aligizaki & Nikolaidis, 2006), de modo que respectivamente, unas células son más delgadas y las otras tienen una forma ovoide.

1.3.2. Ciclo celular

Se ha visto que *Ostreopsis* ofrece una gran diversidad morfológica, pero aún se desconoce cómo las diferentes formas celulares corresponden a las diferentes fases del ciclo celular, del ciclo de vida (*life history*, término más reciente en inglés) y a las transiciones entre cada etapa.

En general, los dinoflagelados presentan un ciclo de vida muy complejo. Pueden presentar dos fases: una fase dominante, con reproducción vegetativa asexual (mitosis), y otra fase dónde se van intercalando eventos de reproducción sexual (meiosis). La división asexual se da en la fase móvil. La célula madre se

divide para producir dos células hijas; la teca se fisiona a lo largo de una sutura entre las placas, y cada célula hereda una parte de la teca (conocido como *desmoschisis*, en inglés) o las células hijas secretan su propia pared celular, la célula progenitora expulsa la teca y flagelos (sufrir una ecdisis), de tal forma que ninguna célula hija hereda la teca (*eleuteroschisis*, en inglés) (Pfiester & Anderson, 1987).

Cuando se dan condiciones por debajo de las óptimas, inducen la reproducción sexual y la formación de gametos. El apareamiento de dos gametos se diferencia de la división vegetativa, ya que la fusión de gametos genera un planozigoto (Accoroni, 2012b).

Además, incluyen períodos con células inmóviles (sin flagelos), con morfologías más redondeadas, formando etapas de reposo en el sedimento, tal y como se muestra en la figura 6.

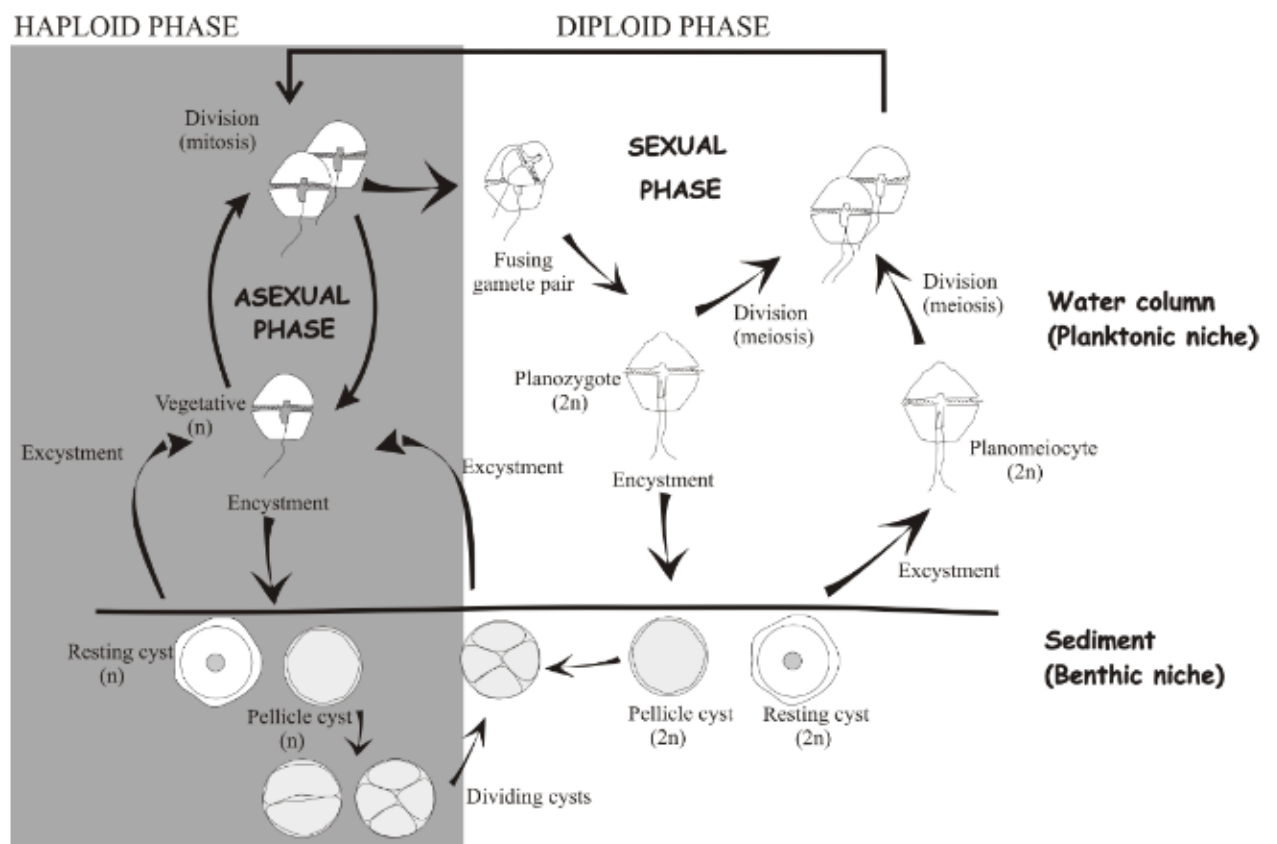


Figura 6: Ciclo celular de los dinoflagelados, con todas las posibles transiciones descritas. Fuente: Bravo & Figueroa, 2014.

El ciclo celular de muchos dinoflagelados incluye al menos una etapa bentónica no flagelada, dónde se forman los quistes. Entendiendo por quiste el estado de resistencia resultado de un proceso de enquistamiento, aflagelado y con una cubierta protectora no muy gruesa. Las células flageladas se desprenden de la teca y sus flagelos, se redondean formando los quistes. Estas fases juegan un papel importante en la ecología de las especies, ya que el quiste permanece en el sedimento cuando las condiciones son desfavorables para el crecimiento vegetativo. Al volver las condiciones favorables, reinocula a la columna de agua (Bravo & Figueroa, 2014). También, pueden desarrollarse estas etapas porque forman parte de su ciclo de vida ordinario.

Se han identificado diferentes tipos de quistes en dinoflagelados, según su morfología, número de capas y el tipo de pared celular (Accoroni *et al.*, 2014) y diferencias funcionales (resistencia a largo o corto plazo) (Bravo & Figueroa, 2014). Tal y como se ve en la figura 6, existen los quistes con una pared más delgada (conocidos como *pellicle cysts*) y otros quistes con una pared más gruesa (llamado *resting cysts*). Los *pellicle cysts* se forman por ecdisis y son el producto de una reproducción sexual o asexual.

Se sabe poco sobre el ciclo de vida de *Ostreopsis cf. ovata* y su dinámica de floración. En Bravo *et al.* (2012) inician el estudio sobre el desconocido ciclo de vida de *O. cf. ovata*, demostrando la reproducción sexual y asexual y describiendo los quistes, tanto en muestras de campo como de cultivos aislados. Los quistes identificados se encontraban incrustados en mucílago, capaces de germinar cuando se daban condiciones favorables al cabo de dos meses y hasta 6 meses después de su formación.

1.3.3. Dinámica poblacional

Los *blooms* de *Ostreopsis* acostumbran a mostrar una clara estacionalidad. Por ejemplo, en las proliferaciones del Mediterráneo se dan los picos de ocurrencia durante principios de verano en el noroeste del mar Mediterráneo y a finales del verano-principios de otoño en el norte del mar Adriático. Durante estos períodos,

las proliferaciones alcanzan sus máximas concentraciones, aunque más tarde, también son posibles las segundas proliferaciones (Aligizaki & Nikolaidis, 2006; Totti *et al.*, 2010; Mangialajo *et al.*, 2011).

La ecuación para calcular la dinámica poblacional de cualquier organismo en general es: $dN/dt = (\text{Reproducción} + \text{Inmigración}) - (\text{Depredación} + \text{Mortalidad} + \text{Dispersión})$, es decir, la dinámica del *bloom* depende del balance entre las ganancias y las pérdidas en el número de células. Si hay un mayor número de duplicaciones celulares (Reproducción) y aportes de células externas al sistema (Inmigración, por advección, por ejemplo, o migración vertical de células) que de pérdidas celulares (Depredación – pastoreo o *grazing*, en inglés-, Mortalidad, Dispersión), entonces se producirá la proliferación. Los parámetros de esta fórmula varían un poco para los dinoflagelados bentónicos (Fraga *et al.*, 2012).

Entre los parámetros útiles que ayudan a describir la evolución de la proliferación tenemos la tasa de crecimiento exponencial o *growth rate* (μ) de la población de células y su inverso, el tiempo de duplicación.

La tasa de crecimiento exponencial se calcula mediante (Guillard, 1973):

$$\mu = K = K_e = \frac{\ln(C_t) - \ln(C_i)}{t},$$

dónde C_t y C_i son las concentraciones celulares finales e iniciales respectivamente, y el t =tiempo transcurrido entre las medidas. Su unidad es de días⁻¹.

Cuando se realizan experimentos en el laboratorio o cuando hay muchas medidas de concentración celular a lo largo del tiempo, se puede calcular la pendiente de la recta del $\ln(N)$ con los datos en fase exponencial, en función del tiempo. La ecuación de la recta que se obtiene es:

$$\frac{dN}{dt} = \mu \cdot t + b$$

La pendiente de esta recta corresponde con la tasa de crecimiento, b es el inóculo inicial.

En los estudios de campo, a menudo no se tienen tantos puntos y se utiliza la fórmula indicada por Guillard.

La tasa de duplicación (su unidad son duplicaciones/día), se obtiene según:

$$K_2 = \frac{\ln(N)}{\ln(2)}$$

El inverso de k_2 corresponde con el tiempo de duplicación, en unidades de tiempo, se calcula:

$$t_D = \frac{1}{K_2}$$

1.3.4. Toxicidad - Palitoxina

Las proliferaciones afectan cada vez a un área más amplia, con mayor frecuencia e intensidad. Recientemente se han dado eventos de *Ostreopsis* spp. en el mar Mediterráneo, en el Atlántico y en las costas de Nueva Zelanda, esto ha despertado un interés en saber qué ocurre con las toxinas. En el mar Mediterráneo, se han dado casos de personas enfermas a causa de *blooms* (Álvarez, 2005, 2006; Brescianini *et al.*, 2006; Illoul *et al.*, 2011; Vila *et al.*, 2008, 2016); además se han descrito varios casos de mortalidades de organismos marinos bentónicos, como erizos de mar, por la acumulación de las toxinas en regiones como la costa atlántica del Brasil (Granéli *et al.*, 2002) o Nueva Zelanda (Shears & Ross, 2009), creando importantes preocupaciones tanto en la salud humana como el estado ambiental.

Las especies de *Ostreopsis* encontradas que pueden resultar tóxicas, mayoritariamente producen la toxina del grupo palitoxina. Se ha demostrado la toxicidad de las siguientes: *O. lenticularis*, *O. mascarenensis*, *O. siamensis* y *O. ovata* (Nakajima *et al.*, 1981; Yasumoto *et al.*, 1987; Ciminiello *et al.*, 2006, 2008; Brissard *et al.*, 2015). También se determinó *O. heptagona* como tóxica, ya que unos

extractos de metanol con esta especie cultivada, resultaron sensible en bioensayos con ratones (Norris *et al.*, 1985).

La palitoxina (PLTX) es una de las toxinas marinas no péptidas más potentes conocidas, pertenece a un grupo de compuestos alifáticos muy venenosos, de peso molecular alto (Habermann *et al.*, 1981). Su fórmula molecular es $C_{129}H_{223}N_3O_{54}$ y su peso molecular de 2680 Da (Moore & Bartolini, 1981). Se trata de una molécula muy compleja con grupos lipofílicos e hidrófilos, y es ligeramente menos tóxica que la maitotoxina (toxina que provoca la ciguatera, *Gambierdiscus toxicus*) en potencia total. Uno de los aspectos característicos de la PLTX es la hemólisis retardada con una pérdida de potasio (Habermann *et al.*, 1981).

Se ha encontrado que las especies tóxicas productoras de palitoxinas, aparte de producir palitoxina putativa, también genera varios análogos de ésta, conocidas como ovatoxinas (OVTX). Los análisis sobre cultivos de *O. ovata* han confirmado la presencia de varias OVTX (de la -a hasta la -k), presentando la ovatoxina-a como principal compuesto (Ciminiello *et al.*, 2008, 2011; Guerrini *et al.*, 2010).

La producción de toxina en la curva de crecimiento es variable y depende del ambiente, además del factor genético de las diferentes cepas. El punto máximo se alcanza durante la fase estacionaria (Guerrini *et al.*, 2010).

Como el género *Ostreopsis* tiene una ecología bentónica, crece adherido a un sustrato mediante la agregación de mucílago o *mucus*. Este mucílago es una estructura compleja, formada por una red de fibras, expulsado a través de los poros de la teca y por una matriz amorfa de polisacáridos ácidos (Honsell *et al.*, 2013; Giussani *et al.*, 2015). Durante una proliferación de *O. cf. ovata*, se forma una alfombra amarronada, distinguible a simple vista. Los estudios existentes enfocados a la matriz mucolítica sugieren que actúa de estrategia para su crecimiento, de defensa contra el pastoreo y microdepredación, además de aumentar la flotabilidad y la regulación metabólica (Reynolds, 2007).

Aún no se ha confirmado un rol toxicológico activo de esta mucosidad, aunque cuando se han dado episodios de mortalidad o daños a los organismos bentónicos, los organismos estaban cubiertos con el mucílago amarronado (Vila *et al.*, 2008; Shears & Ross, 2009; Totti *et al.*, 2010).

1.3.5. Antecedentes: distribución y problemática

Desde la primera vez que se identificó el género *Ostreopsis*, se ha visto ampliamente distribuido, con mayor número de *blooms* registrados cada año y nuevas localizaciones. A continuación, se presenta brevemente la distribución global de las microalgas y sus repercusiones. Además de hacer hincapié en el mar Mediterráneo y en especial, a la problemática de Sant Andreu de Llavaneras.

- Distribución global

La primera especie hallada de este género en muestras de plancton fue *Ostreopsis siamensis* por Schmidt en el Golfo de Siam (Tailandia), a principios del siglo pasado (1902). Más tarde en 1981, Fukuyo volvió a describir *O. siamensis* e identificó dos especies nuevas, *O. lenticularis* y *O. ovata* a partir de muestras procedentes de la Polinesia Francesa y las islas Ryūkyū. Las especies de *Ostreopsis* son componentes comunes de la microflora epífita/béntica, que habitan los ambientes marinos de las aguas tropicales y subtropicales (Tindall & Morton, 1998), aunque cada vez más a menudo se encuentra en aguas templadas (Rhodes, 2011).

En el mapa (fig. 7) de Zingone (Berdalet *et al.*, 2012), actualizado a partir del artículo de Rhodes (2011), se muestra la distribución a nivel global del género *Ostreopsis*.

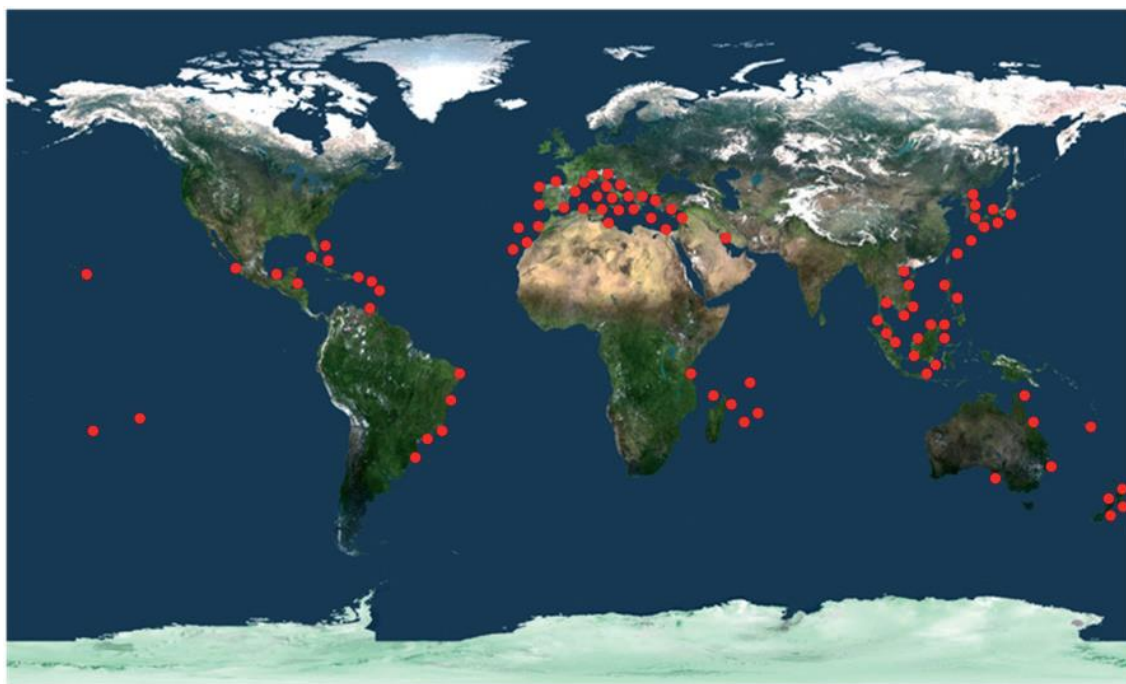


Figura 7: Distribución global del género *Ostreopsis*. Fuente: Berdalet *et al.* (2012)

Desde la primera distribución que hizo Faust *et al.* (1996), es evidente el aumento notable que se ha dado desde entonces, en parte, debido a un muestreo más intensivo, la mejora de las tecnologías y los métodos de detección molecular. Estos hechos han facilitado su identificación en los últimos años. Entre las especies más extendidas, se encuentran *O. siamensis* y *O. ovata*. Por lo que hace a las menos dispersas son *O. belizeanus*, *O. caribbeanus*, *O. heptagona* (Rhodes, 2011). Se cree que a medida que se vaya investigando sobre las floraciones bentónicas, la distribución en el mapa irá cambiando.

Las proliferaciones ocurridas en la zona de Australasia, por el momento, no ha habido incidentes sobre la salud humana, aunque sí se han encontrado evidencias como rastros de microalgas en las tripas de crustáceos y moluscos (Rhodes *et al.*, 2002). Los erizos de Nueva Zelanda son especialmente vulnerables a los *blooms* de *O. siamensis*, ya que les provoca la pérdida de espinas hasta incluso alcanzar la mortalidad masiva (Shears & Ross, 2009).

Originalmente, se encontró por primera vez en el Golfo de Tailandia, el siglo pasado. Desde entonces, se han ido registrando cepas tóxicas en las aguas de

Japón (Fukuyo, 1981; Nakajima *et al.*, 1981; Yasumoto *et al.*, 1987), además de determinar la presencia de componentes tóxicos. En las Filipinas, se detectó la palitoxina en cangrejos cultivados, evento que se vinculó a dos muertes humanas (Gonzales & Alcala, 1977).

En Hawaii, se detectó una especie desconocida que aún están estudiando, *Ostreopsis* sp. 1, gracias al muestreo intensivo de la costa hawaiana (Parsons & Preskitt, 2007). *O. lenticularis* forma parte de la flora epífita de los arrecifes someros de coral del Caribe (Carlson & Tindall, 1985), igual que en la costa noroeste de Cuba. En 1998, se detectó una proliferación a lo largo de 400 km en la costa de Brasil, que también provocó la mortalidad de erizos de mar (Granéli *et al.*, 2002).

En el noroeste de Madagascar, en las Comores, se ha considerado que las proliferaciones de dinoflagelados epífitos, incluyendo *Gambierdiscus* spp. y casi todas las especies descritas de *Ostreopsis*, son las responsables del blanqueo de coral (Turquet *et al.*, 2001).

También se han aislado *Ostreopsis* a partir de muestras recogidas en el Atlántico, de las islas del noroeste de África, como las Islas Canarias y Madeira (Riobó, 2006).

Por lo tanto, se consideran floraciones efímeras pero que se están volviendo más intensas en áreas tropicales y en aguas cada vez más templadas y protegidas por el oleaje. Es probable que se necesite una temperatura umbral mínima para que se dé la proliferación, además de otras condiciones diferentes que expliquen mejor su dinámica (Mangialajo *et al.*, 2011), por lo que, aún queda mucho por investigar para determinar más concretamente sus causas.

- Mar Mediterráneo

El primer brote de *Ostreopsis* en el mar Mediterráneo, fue reportado en 1972 por Taylor (1979) en Villefranche-sur-Mer (Francia). Más tarde, en el 1994 se encontró *O. cf. ovata* en las costas de Italia, concretamente en el mar Tirreno

(Tognetto *et al.*, 1995) y en los años 1997/98 en las costas catalanas (Vila *et al.*, 2001b).

Durante las últimas décadas, se han dado extensas proliferaciones de *Ostreopsis* spp. más intensas y frecuentes en muchos puntos del Mediterráneo. Han sido localizadas en España, Francia, Grecia, Argelia, Italia, Túnez, Turquía, Egipto y Líbano (Turki, 2005; Aligizaki & Nikolaidis, 2006; Zingone *et al.*, 2006; Ciminiello *et al.*, 2006; Riobó *et al.*, 2006; Monti *et al.*, 2007; Vila *et al.*, 2008; Guerrini *et al.*, 2010; Mabrouk *et al.*, 2011; Mangialajo *et al.*, 2011; Illoul *et al.*, 2011) provocando problemas a los usuarios de las playas, residentes y trabajadores cercanos a los puntos afectados.

Las únicas especies del género *Ostreopsis* reconocidas en el mar Mediterráneo son *O. cf. ovata* (Fukuyo) y *O. cf. siamensis* (Schmidt), en especial en la zona del Mediterráneo norte, dónde se han registrado episodios tóxicos en varios puntos de la costa (Mangialajo *et al.*, 2011). En las zonas más rocosas, el genotipo *ovata* es el más abundante y ampliamente distribuido, en concreto se estudió en zonas del mar Adriático y mar Tirreno (en Italia) y la Costa Brava (en Cataluña) (Battochi *et al.*, 2010). El genotipo *O. siamensis* se ha detectado en las costas del Atlántico en Marruecos y Portugal, en el noreste de España y en el suroeste de Italia (Vila *et al.*, 2001b; Amorim *et al.*, 2010; Bennouna *et al.*, 2010; Laza-Martinez *et al.*, 2011) y su morfotipo se ha encontrado en las costas africanas (Turki, 2005; Mabrouk *et al.*, 2011).

Las proliferaciones ocurrentes de *Ostreopsis* spp. causan un problema emergente, ya que la exposición a aerosoles marinos durante los períodos de verano se ha asociado con problemas de salud humana en algunas localidades de la costa Mediterránea, desde 1998 (Vila *et al.*, 2008, 2012; Sansoni *et al.*, 2003). Los principales síntomas que se manifiestan por la existencia de estas microalgas son: fiebre, irritaciones respiratorias (broncoconstricción, rinitis, disnea), irritaciones cutáneas, y malestar general. Se asocian con la presencia de compuestos del tipo palitoxina (Ciminiello *et al.*, 2006, 2011; Riobó *et al.*, 2006) y con el componente principal ovatoxina-a (Ciminiello *et al.*, 2006, 2011).

Las personas afectadas acostumbran a ser residentes cercanos al punto de crecimiento de las microalgas, o gente que ha sido expuesta algunas horas, ya sea por actividades de ocio o por trabajo. La mayoría de los síntomas desaparecen al cabo de unas horas de alejarse del punto de infección, sin necesidad de medicación, solo en pocos casos graves, ha sido necesaria la hospitalización (Brescianini *et al.*, 2006).

A continuación, en la tabla V, extraída de Vila *et al.* (2016), se muestran los diferentes estudios e informes publicados sobre la afectación de la salud humana asociados a los *blooms* de *O. cf. ovata* en el mar Mediterráneo.

En la parte del noroeste del mar Mediterráneo, se da un hecho curioso. En los 800 km de costa catalana, hay instalados alrededor de 50 puertos, además de otras infraestructuras y modificaciones menores hechas por el hombre. Los puertos originan graves modificaciones del ecosistema, ya que afecta a la dinámica natural del mar, reduciendo la turbulencia, incrementando el tiempo de residencia del agua y también acumulan una alta concentración de nutrientes (Vila *et al.*, 2001a). Los puertos terminan convirtiéndose en “semilleros” (*seed beds*, en inglés), al tener poca profundidad, reducirse la dispersión y permitiendo la acumulación de quistes. Por lo que las infraestructuras portuarias podrían ser consideradas como favorecedoras de estos tipos de eventos.

Año	Localidad	Personas afectadas	Impactos al ecosistema	<i>Ostreopsis</i> (células/L)	Referencia
1998	NO Mediterráneo (España - Llanerers)	-	Erizos, mejillones	20x10 ⁴	Vila <i>et al.</i> (2008)
1998 2000 2001	Mar Tirreno (Italia)	~100	Sí	-	Sansoni <i>et al.</i> (2003)
2001 2003 2004	S Adriático (Italia)	28	-	-	Gallitelli <i>et al.</i> (2005)
2004	NO Mediterráneo (España - Llanerers)	74 (estimadas ~200)	No	2 · 10 ⁴	Vila <i>et al.</i> (2008); Álvarez <i>et al.</i> (2005)
2005 2006	Mar de Liguria (Italia)	228 19	-	-	Brescianini <i>et al.</i> (2006)
2006	NO Mediterráneo (España - Llanerers)	37	No	0.2 · 10 ⁴	Álvarez (2006)
2006- 2009	NO Mediterráneo (Francia)	47	-	>3 · 10 ⁴	Tichadou <i>et al.</i> (2010)
2006	SO Mediterráneo (España-Almería)	57	-	0.1 · 10 ⁴	Barroso García <i>et al.</i> (2008)
2009	SO Mediterráneo (Argelia)	150-200	Sí	8 · 10 ⁴	Illoul <i>et al.</i> (2011)
2010	Mar Adriático (Croacia)	7	-	4 · 10 ⁴	Pfannkuchen <i>et al.</i> (2012)
2013	NO Mediterráneo (España - Llanerers)	13	No	5 · 10 ⁴	Vila <i>et al.</i> (2016)
2014	NO Mediterráneo (España - Llanerers)	7	No	200 · 10 ⁴	Berdalet, Vila, Abós-Herràndiz (datos no publicados)

Tabla V: Estudios realizados sobre los impactos en la salud humana asociados a las proliferaciones de *Ostreopsis* en el mar Mediterráneo. La concentración de *Ostreopsis* es el valor máximo detectado en el área.

- Sant Andreu de Llanerers

La ocurrencia de *Ostreopsis* spp. en la playa de Sant Andreu de Llanerers durante los períodos de verano, se ha asociado a problemas sobre la salud humana desde 1998.

En agosto del 1998, se dio un caso de mortalidad de fauna bentónica (en concreto de erizos de mar) cerca de la riera de Argentona, al sur de Mataró, afectando 1 km de costa, justo después de una tormenta. Incluso, provocó la mortalidad de los peces del acuario del restaurante Pins Mar, situado en Llavanes (Vila *et al.*, 2010), ya que recogían agua de mar para rellenar la pecera. La concentración máxima detectada de ese evento en Llavanes fue de $2 \cdot 10^5$ células/L (Vila *et al.*, 2008).

A principios de agosto del 2004 se detectó un brote epidémico en unos apartamentos de Sant Andreu de Llavanes. Se determinó que no se había producido un vertido de productos químicos, por lo que se creyó que el causante era la presencia de *Ostreopsis* spp. en la costa. Fueron detectados 74 enfermos, aunque se cree que los afectados reales superaron a las 200 personas. La mayoría de las personas afectadas presentaba rinorrea, irritación nasal, irritación de faringe, tos, expectoración, irritación conjuntival y cefalea. Las exposiciones más frecuentes de los afectados se dieron en los que vivían en uno de los bloques de los apartamentos y a los que habían estado en la playa de la Estación, ambos lugares cercanos a las rocas donde rompían las olas. Al muestrear el agua de mar, se presenciaron altas concentraciones de *Ostreopsis* spp., con unas concentraciones máximas de 23101 células/litro (Álvarez *et al.*, 2005; Vila *et al.*, 2008). La duración media de este brote fue de varios días, probablemente porque el lugar en el que ocurrió el *bloom* estaba cerca de donde los perjudicados desarrollaban su vida diaria y el tiempo de exposición fue mayor. De hecho, algunos afectados al alejarse del punto (*hot spot*) les disminuían los síntomas hasta erradicarse, pero al volver reaparecían. Más tarde, en 2006, se volvió a dar otro brote, esta vez afectó a 37 personas (Álvarez, 2006), tal y como se muestra en la tabla V.

En los veranos del 2007–2009, se recogieron muestras en este punto, además de otras localidades a lo largo del noroeste mediterráneo y la costa noreste adriática (Mangialajo *et al.*, 2011). El monitoreo continuado durante estos 3 años en la costa catalana se desarrolló dentro del proyecto EBITOX. Con el estudio de

Mangialajo *et al.* se quería recopilar registros de *Ostreopsis* en una escala temporoespacial larga. Así se podía analizar la relación entre la abundancia celular, la intensidad y periodicidad de la proliferación y el rol que jugaba la temperatura en los distintos puntos del Mediterráneo.

En 2013, se hizo un estudio epidemiológico y ecológico, volviendo a muestrear en este mismo *hot spot* durante los meses de junio hasta finales de noviembre. Ya se conocía la temporalidad del *bloom* en esta zona debido a las investigaciones anteriores como Vila *et al.* (2008, 2012) y Mangialajo *et al.* (2011). Para realizar el estudio epidemiológico, Vila *et al.* (2016) cogió como grupo cohorte, los trabajadores del restaurante situado justo en frente de la zona dónde se da el *bloom*. Tanto hombres como mujeres, estaban expuestos directamente a los aerosoles marinos durante toda su jornada de trabajo, ya que el restaurante consta de parte interior y una terraza. La mayoría experimentaron algunos de los síntomas esperados.

Por lo tanto, queda justificada la importancia de este *hot spot* en la costa catalana, y el interés en hacer el seguimiento de esta microalga que aparece casi cada año.

Los parámetros fisicoquímicos más importantes a la hora de analizar las características son: la distribución de la microalga bentónica, la temperatura del agua, la salinidad, la hidrodinámica, la concentración de nutrientes, el tipo de sustrato y la disponibilidad de luz. Por lo que hace a aspectos biológicos, la presencia de herbívoros que pastan y los competidores con otras microalgas. Hay que considerar la competitividad existente para la colonización del sustrato, la luz y los nutrientes (Carnicer, 2015).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

El propósito principal de este estudio es caracterizar las formas de vida del dinoflagelado tóxico *Ostreopsis* cf. *ovata* y la variabilidad de ciertos compuestos bioquímicos producidos por esta microalga en función de su estado fisiológico. Por este motivo, se realizó el seguimiento de unos cultivos a lo largo de las distintas fases de la curva de crecimiento en el laboratorio.

Se investigó la variabilidad de los valores obtenidos considerando que la microalga forma agregados, debido al mucílago producido para adherirse a los sustratos (rocas o algas). También se tuvo en cuenta que los cultivos, aun siendo monoespecíficos, contenían bacterias.

Este estudio previo, servirá para obtener información necesaria y básica para comprender la dinámica de *O. cf. ovata* en experimentos de laboratorio y en el hábitat natural, sobre todo con relación a sus proliferaciones nocivas.

2.2. Objetivos específicos

Para lograr el objetivo general del trabajo, se plantearon una serie de objetivos específicos:

- Cuantificar la evolución del número de células del cultivo de *O. cf. ovata*.
- Determinar la dinámica de las bacterias marinas presentes en el cultivo.
- Analizar la concentración de clorofila de *O. cf. ovata*, como medida de biomasa fotosintética.
- Identificar las formas y tamaños celulares.
- Caracterizar la evolución de la biomasa de *O. cf. ovata* como biovolumen celular.
- Describir la variabilidad de formas celulares (vegetativas, quistes) en las distintas fases de crecimiento del cultivo de *O. cf. ovata*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Protocolo de muestreo en la costa

En 1994 se inició el programa de seguimiento del fitoplancton tóxico en la costa catalana, por parte de la Agencia Catalana del Agua (Generalitat de Catalunya) en coordinación con el Instituto de Ciencias del Mar – CSIC. En 1998 se detectó la primera proliferación de *Ostreopsis* que afectó a fauna macrobentónica (erizos, sobre todo) de la playa de Lllavaneres y provocó la mortalidad de los peces de un acuario situado cerca de la proliferación. A partir de aquí, ha habido un seguimiento continuado de las proliferaciones en diferentes puntos de la costa catalana y de las Islas Baleares. En particular, la zona de Lllavaneres es muestreada desde que en 2005 aparecieron casos de personas con problemas respiratorios. Los proyectos EBITOX y OstreoRisk (este último actualmente en desarrollo) han servido para hacer el seguimiento durante todos estos años en dicho tramo costero con proliferaciones frecuentes de *O. cf. ovata*.

La zona de recogida de muestras es la playa de Sant Andreu de Lllavaneres (perteneciente a la comarca del Maresme, Cataluña), localidad situada a tan solo 36 km al norte de la ciudad de Barcelona. Esta playa presenta una plataforma rocosa, de poca profundidad y con un denso recubrimiento de macroalgas. La playa sedimentaria es muy estrecha, dependiendo de la época del año queda sumergida y no siempre se encuentra visible. Este hecho viene dado por la combinación de los pocos aportes procedentes de la rambla y los temporales de levante. Uno de los principales aportes sedimentarios en la franja litoral son los ríos y rieras, como en nuestro caso, la riera de Lllavaneres que cruza todo el municipio. Durante muchos años, estas fuentes de agua han sufrido los efectos adversos de canalizaciones, de la construcción de infraestructuras y también de la extracción de áridos en sus cauces. Estas intervenciones han provocado una reducción significativa del volumen de áridos que las ramblas transportan hasta la costa, disminuyendo la cantidad de sedimentos aportados en las playas del Maresme de manera natural. Por otro lado, se suma el régimen de las tormentas

de levante. Durante la temporada de otoño-invierno son comunes los temporales de levante que aportan o sustraen arena de la zona costera, afectando a las playas y franja litoral.

El sustrato rocoso se extiende desde la línea de costa hasta por lo menos 5-7 metros de profundidad. Éste se encuentra recubierto por unas comunidades de macroalgas, principalmente dominan las algas rojas calcáreas articuladas (Rhodophyceae), tales como los géneros *Corallina*, *Ellisolandia*, *Jania* y las algas pardas (Phaeophyceae) tales como los géneros *Dictyota*, *Halopteris*, *Padina*.

La proliferación de *Ostreopsis* cf. *ovata* se desarrolla en verano. Concretamente cuando se dan las concentraciones más elevadas es durante los meses de julio a septiembre, período en que se muestrea semanalmente. Durante el mes de junio, y de octubre a diciembre los muestreos son quincenales o mensuales, dado que las concentraciones son mucho más bajas (Vila *et al.*, 2008, 2012). Cada año, las proliferaciones tienen una evolución distinta, por lo que la frecuencia de los muestreos se debe adaptar a las características de éstas.

Los parámetros ambientales como la temperatura y salinidad, se miden *in situ* en cada punto de muestreo mediante un sensor multiparamétrico (modelo Cond 330i, WTW). Dado que cada especie tiene su rango óptimo para un desarrollo favorable, lo cual determina su distribución biogeográfica, estos parámetros son muy importantes ya que influyen en la fisiología de las microalgas.

Además, en cada punto se recogen muestras tanto planctónicas como bentónicas para medir los parámetros biológicos básicos que permiten el seguimiento de la proliferación de *Ostreopsis*: concentración de clorofila, abundancia de especies en la columna de agua y abundancia de especies epífitas en la macroalga.

Puesto que los especímenes planctónicos y bentónicos de esta microalga no se distribuyen de manera uniforme, sino que presentan cierta variabilidad espacial, se escogen dos puntos de muestreo con una separación de tan solo unos 500

metros, con características ambientales un tanto diferentes. Uno de los puntos de muestreo queda menos expuesto al oleaje, con aguas muy someras y sustrato más uniforme (principalmente roca sedimentaria, muy llana). La otra zona de muestreo se encuentra más expuesta, con aguas más profundas y un sustrato más irregular (con roca y arena).

Para recoger las muestras se sigue el siguiente procedimiento: primero se muestrea el plancton y luego se muestrea el bentos. Es importante seguir este orden ya que así no se contamina la toma de muestras de plancton; si se hiciera al revés, al manipular primero la macroalga se está provocando la resuspensión de las microalgas adheridas y después al recoger la muestra de agua se cogería una concentración mayor de células (las planctónicas y las bentónicas-epífitas).

Para la cuantificación de fitoplancton en la columna de agua, se recoge agua cerca del manto de algas y se fija con lugol (ver sección Preparación de la muestra y conservación). Para determinar la abundancia de especies epífitas se recoge una muestra de macroalga con agua de mar filtrada y se agita durante un minuto para que las células de *Ostreopsis* se desprendan de su sustrato (la macroalga). Después, se filtra la muestra por una criba (de 200 μm) para separar los trozos de macroalga y otros organismos. La fracción de agua resultante también es fijada con lugol.

3.2. Preparación de un cultivo *Ostreopsis cf. ovata*

Para la realización de los experimentos de fisiología en el laboratorio es necesario disponer de un cultivo sano de *Ostreopsis cf. ovata*. Primero, hay que aislar una célula madre del hábitat natural y así conseguir una cepa, que en el medio de cultivo adecuado, servirá para realizar los experimentos y analizar los distintos parámetros a estudiar.

Una sola célula de microalga es aislada de una población natural, mediante el método de pipeta capilar en una microplaca con múltiples pocillos para facilitar

el aislamiento celular. La célula madre procede de una muestra de agua de mar recogida en Lllavaneras, el mes de julio de 2015.

Aunque el cultivo obtenido es monoespecífico (es decir, solo hay células de la especie *Ostreopsis cf. ovata*), no es axénico, ya que sí se encuentran bacterias marinas procedentes del medio natural.

Guillard (1975) describe tres tipos de medio de cultivo para fitoplancton en general: el de agua de mar natural enriquecida, el de agua de mar artificial y el de agua dulce. Los medios de cultivo para especies marinas más utilizados basados en agua de mar enriquecida son el L1, el K y el f/2. Se diferencian por contener distintas concentraciones de stocks de macronutrientes (N, P y Si) y micronutrientes (metales y vitaminas).

Nuestras microalgas crecen en un medio f/2-Si, obtenido a partir de agua de mar filtrada y enriquecida con nutrientes sin añadir silicato, el cual no es necesario para los dinoflagelados y como precipita fácilmente, no se suele incluir. Para obtener el medio, se filtra el agua de mar, se esteriliza en el autoclave y se deja enfriar durante un día entero. La preparación de 1 L de medio de cultivo supone utilizar 1 mL de solución madre (stock con nutrientes y metales) y ½ mL del stock de vitaminas. Los macronutrientes principales son: NaNO_3 , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; los metales (microelementos) a añadir son: $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; y las vitaminas que contiene son: tiamina HCl, biotina y B_{12} . La preparación tiene que ser en condiciones estériles, de modo que se trabaja bajo la campana de flujo laminar y cada vez que se añade un componente se cambia la punta de la pipeta.

Las cepas de *Ostreopsis* se mantienen en frascos de plástico transparente del tipo utilizado para cultivos de tejidos de 50 mL. Como la especie es bentónica, los frascos se ponen horizontales para maximizar la superficie de crecimiento, como se puede apreciar en la figura 8.



Figura 8: Conservación de los frascos de cultivo de especies bentónicas en la incubadora.

Cada 15 días aproximadamente se realizan transferencias de los cultivos a un medio nuevo, se inocula cultivo madre en el nuevo medio, en la proporción de 5-10 % del volumen final. De esta manera, los cultivos se mantienen activos, sin envejecer y se obtienen cultivos *stock*.

Para realizar experimentos es necesario aumentar el volumen de los cultivos, mediante la técnica del *scale up* (esquema en la figura 9). Para ello se realizan inoculaciones en frascos de mayor tamaño de manera progresiva (al cabo de una semana), tal y como se muestra en el esquema siguiente:

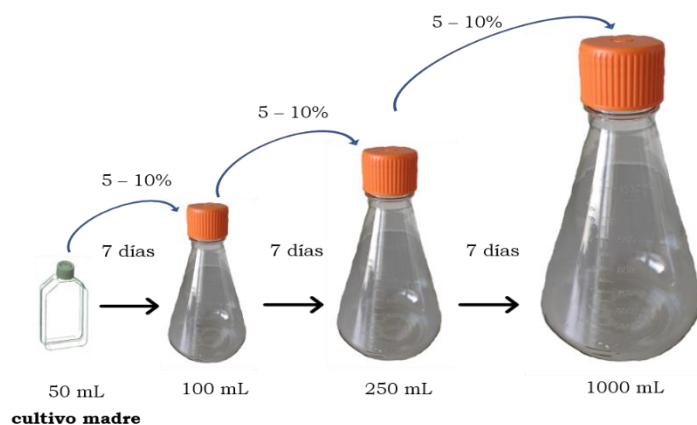


Figura 9: Esquema de la técnica *scale up*, para la preparación del cultivo.

De este modo, se obtienen “cultivos semi-continuos” en fase exponencial en el momento de realizar la transferencia.

Para calcular el volumen de inóculo, se intenta que la proporción sea del 5-10% (madre:total), pero hay que tener presente el número de células del cultivo para iniciar el experimento según la expresión:

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f,$$

siendo C_i y C_f , las concentraciones inicial y final, respectivamente. V_i y V_f , los volúmenes inicial y final, respectivamente.

Por lo tanto, tienen que ser proporcionales la concentración y el volumen iniciales con la concentración y volumen finales. En nuestros experimentos la concentración inicial de células fue de aproximadamente 200 células por mililitro.

3.3. Preparación de la muestra y conservación

Una vez la muestra ha sido recogida del campo o de los frascos experimentales del laboratorio se tiene que fijar inmediatamente para su correcta conservación. Aclarar que no existe ningún fijador universal que sea el adecuado para todos los tipos de microalgas, sino que se debe seleccionar en función del estudio que se quiera realizar. Los fijadores y agentes conservantes más comunes son la solución de yodo con yoduro de potasio (I_2+IK) y el formaldehído neutralizado (HCOH).

La solución de yoduro potásico más bien conocido como solución de lugol, tiene un efecto inmediato, por tanto, preserva la muestra en el momento que se le añaden unas gotitas, hasta obtener una solución de color whisky. Además, provoca que los organismos padezcan un ligero aumento de peso, por lo que reduce el tiempo de sedimentación para su observación. Es el más recomendado para el recuento de fitoplancton y microalgas bentónicas ya que no destruye los dinoflagelados fijados, además, es una sustancia más manejable que el formol y no es tóxica.

Debe tenerse en cuenta que las muestras fijadas con lugol se deben conservar sin que les toque la luz, ya que esta sustancia se degrada por fotooxidación. Con

el tiempo, las muestras perderán color, así que hay que controlar periódicamente y añadir unas gotas de reactivo si fuera necesario.

Las muestras conservadas con formaldehído permanecen estables durante mucho más tiempo, al ser un fijador y conservador ácido. No es adecuado para fijar células sin membrana, ya que distorsiona la forma, se pierden los flagelos e incluso pueden llegar a desintegrarse las células.

Durante los experimentos en el laboratorio, se recoge el volumen adecuado de muestra para cada parámetro a estudiar, el día que toca muestreo, y se conservan en tubos de plástico (por ejemplo, del tipo "Falcon") con unas gotitas de sustancia fijadora (lugol neutro).

3.4. Experimentos de fisiología en el laboratorio

El propósito general de los experimentos fisiológicos es caracterizar el cultivo de *Ostreopsis cf. ovata* con varios parámetros. En este trabajo se exponen los resultados obtenidos al estimar el número de células de esta microalga, la cantidad de bacterias, la concentración de clorofila, y las diferentes formas celulares encontradas. Todos estos resultados permitirán describir la evolución del cultivo.

Para las tres tandas de experimentos, se calcula el volumen a inocular en función a la concentración del cultivo madre y de la concentración con la que se quiera partir (en nuestro caso, aproximadamente es de 200 células mL⁻¹). Es recomendable que el volumen inoculado no supere el 10% del volumen total. El cultivo madre junto con el medio f/2 tienen un volumen total de 800 mL.

Los recipientes utilizados son frascos de Fernbach. Aproximadamente era necesario 80 mL de cultivo madre, para obtener la concentración inicial deseada.

Experimento 1: Preparación técnicas de muestreo

El objetivo principal es averiguar qué técnica es la más adecuada para hacer la recogida de muestras de los frascos. Como el cultivo de la microalga a estudiar produce agregados, se realiza la toma de muestras, con diferentes tratamientos previos de los frascos.

El día 28/06/2016 se inocula el frasco #B y el 29/06/2016 el frasco #A. Para hacer la recogida de muestras en los días estipulados, primero se pipetea sin manipular el frasco, se recogen tres réplicas. Luego, se agita suavemente el frasco y se cogen tres réplicas. Y por último, se agita vigorosamente el frasco y también se recogen otras tres réplicas.

Experimento 2: Preliminar

En este experimento, se hace la primera caracterización y seguimiento del cultivo. Siguiendo el tratamiento obtenido en el primer experimento, además de considerarse la primera toma con la técnica de muestreo y análisis de datos.

El día 30/06/2016 se inocula en tres frascos Fernbach, con las etiquetas #1, #2 y #3. Se empieza a muestrear el 1/06/2016 hasta el 12/07/2016. Cada día que toca recoger muestras, se muestran dos fracciones de cada frasco: sin agitar el frasco y procurando no coger ningún grumo de mucílago (*Free* o *suspended*) y agitando el frasco como se obtuvo en el experimento anterior (*Total*).

Además, se recogen muestras para filtrar y posteriormente analizar las bacterias presentes. También, para determinar la concentración de clorofila durante este período de tiempo.

Experimento 3: Avanzado

Este experimento se realiza de forma más avanzada ya que se determinan más parámetros que el anterior. El procedimiento desarrollado es el mismo que en el experimento preliminar.

El día 11/07/2016 se inoculan tres frascos etiquetados como #A, #B, #C. Se empieza a muestrear el día 12/07/2016 hasta el 22/07/2016. En cada día de muestreo, también se recogen dos fracciones: *Free* y *Total*.

Los otros parámetros estudiados son las bacterias presentes y la concentración de clorofila. Adicionalmente, se determina el volumen celular y se analiza la variabilidad morfológica que presenta el cultivo.

Los cultivos experimentales son mantenidos en una cámara de temperatura controlada (23 ± 0.5 °C), y una irradiación de $120 \mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ combinando Grolux -58 W y tubos fluorescentes en una proporción de 1:1, es decir un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (8-20h.). Además, en cada tiempo se va cambiando la situación de los tres frascos en la cámara para conseguir unas condiciones más igualitarias.

3.5. Métodos de análisis de los parámetros estudiados

Los parámetros obtenidos y medidos a partir de las muestras de los experimentos son: el número de células en las distintas fases del cultivo, que determinarán la evolución y su curva de crecimiento; el seguimiento bacteriano, ya que las bacterias crecen a expensas de la microalga; la cantidad de clorofila presente en la muestra durante los distintos días de muestreo; y mediante el análisis fotográfico, se obtendrá el tamaño celular de las muestras en los diferentes tiempos para estimar el volumen de la biomasa y una categorización celular.

1. Recuento celular de *Ostreopsis*

En muchas regiones del mundo existe una monitorización continuada de las proliferaciones de algas para proteger la salud humana, la industria de la acuicultura y los ecosistemas. De este modo, se corrobora la importancia de buscar diferentes métodos para poder cuantificar la abundancia, composición y diversidad de las muestras de proliferaciones naturales recogidas en la costa, y

el interés de hacer un seguimiento y caracterizar los cultivos experimentales en el laboratorio.

La obtención del número de células presentes en un volumen determinado es necesario para dar información sobre la tasa de crecimiento, la cantidad de biomasa, la evolución del cultivo, además de ser útil para poder compararlo con otros parámetros que se quieran estudiar y tomarlo como datos de referencia.

Dependiendo del tipo de muestra que se tenga, habrá que seleccionar el material según el que mejor se adapte a las características del cultivo, teniendo en cuenta la densidad del cultivo, el tamaño y la forma de las células, sin olvidar la presencia y cantidad de membranas extracelulares como el mucílago disuelto.

Los métodos descritos en este trabajo para realizar el recuento de cultivos de microalgas no necesariamente tienen que ser también útiles para contar las microalgas en ambientes naturales. Para enumerar las poblaciones naturales generalmente hay que hacer uso de métodos sedimentarios del fitoplancton más cuidadosos, ya que normalmente puede requerirse mayor volumen de muestra. Para las muestras de campo que generalmente tienen bajas densidades celulares se utiliza el método de Utermöhl con cámaras de sedimentación de 10 a 100 mL, aunque en nuestro cultivo, el método más adecuado ha sido el de Sedgewich-Rafter.

En la tabla VI, se muestran los instrumentos más óptimos para el recuento celular de los cultivos, en función de sus características y usos, descritos por Guillard (1973).

Instrumentos de recuento	Tamaño recomendable para su manejo (μm)	Densidad de cultivo recomendable (células mL^{-1})
Sedgewick-Rafter	50 - 500	$30 - 10^4$
Palmer-Maloney	5 - 150	$10^2 - 10^5$
Cámara de Neubauer (profundidad de 0.2 mm)	5 - 75	$10^3 - 10^7$
Cámara de Neubauer (profundidad de 0.1 mm)	2 - 30	$5 \cdot 10^4 - 10^7$
Petroff-Hausser	<1 - 5	$10^5 - >10^8$

Tabla VI: Instrumentos de recuento y su uso. Fuente: Guillard (1973).

- Método de Sedgewich-Rafter

La cámara Sedgewick-Rafter es un método tradicional que se usa para obtener la cantidad de células presentes por mL, de modo que permite hacer un recuento de un volumen conocido y así obtener la curva de crecimiento del cultivo. Se trata de un método rápido que se usa cuando hay que cuantificar muestras con una gran densidad de células (hasta del orden de 10^4 céls mL^{-1}), como es el caso de una proliferación de microalga en sus picos más altos o en cultivos de laboratorio.

La lámina está comprendida por una base transparente con una cámara centrada fija de una capacidad de 50 mm x 20 mm x 1 mm, por lo que puede contener en total $1000 \text{ mm}^3 = 1000 \mu\text{L} = 1 \text{ mL}$. La base consta de una rejilla con un total de 1000 cuadraditos de 1 μL cada uno. Esta cámara se cubre con un cubreobjetos que protege a la muestra de la desecación y manteniéndola dentro.

La muestra previamente fijada con disolución de lugol, se distribuye en la cámara mediante la ayuda de una pipeta Pasteur, como se puede apreciar en las imágenes de la figura 10, siguiendo los pasos del manual de la IOC, se cubre con el cubreobjetos adecuado y ya está lista para ser analizada con el microscopio.

Para realizar el recuento de la cámara se utiliza un microscopio compuesto invertido de campo claro y con contraste de fase, procurando usar el aumento de 10X.

Hay que tener en cuenta, que antes de la preparación en la placa Sedgewick-Rafter, se debe homogenizar la muestra, mediante la agitación del tubo Falcon con movimientos firmes horizontales y verticales (forma radial), pero a la vez con suavidad. Hay que tener especial cuidado al realizar la agitación para evitar que las células se rompan, dado que solo se pretende deshacer el *mucus* que genera la microalga y repartir bien las células.

Es importante tomar nota de la superficie de la cámara contada, el número de aumento usado, aunque se recomiendan los objetivos de 10X o 20X, el modelo de microscopio y cualquier observación que se considere importante.

Para obtener un valor fiable y robusto estadísticamente, hay que contar un cierto número de células. De modo que se marca un número de recuento mínimo de 400 células, para tener un límite de confianza $\pm 10\%$, como se muestra en la tabla VII.

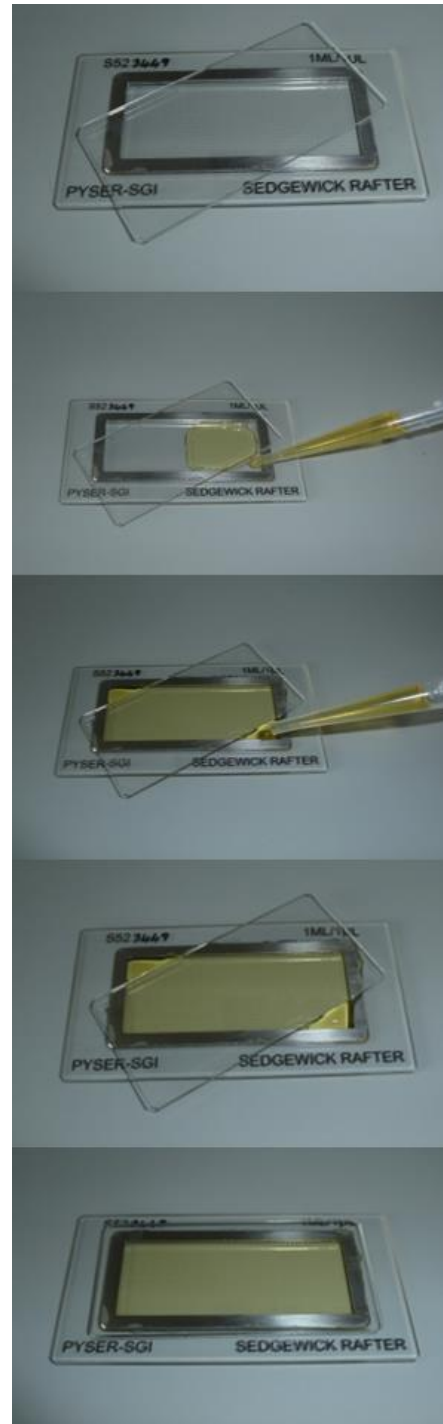


Figura 10: Proceso de vertido de la muestra, fijada con lugol, en la cámara Sedgewick-Rafter.

La precisión que se desee alcanzar determinará el número de unidades a contar, normalmente está expresada como el límite de confianza al 95%, como proporción de la media, y viene dada por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Precisión} = \frac{2 \cdot 100}{\sqrt{N^{\circ} \text{ células contadas}}}$$

Para la mayoría de muestras de los tiempos iniciales se tuvo que contar toda la superficie de la cámara, debido a su baja concentración durante la temprana fase exponencial.

Nº de células contadas	Límite de confianza +/- (%)	Límite absoluto si la densidad de células estimado es de 500 células · L ⁻¹
1	200	500 ± 1000
10	63	500 ± 315
50	28	500 ± 140
100	20	500 ± 100
200	14	500 ± 70
400	10	500 ± 50
500	9	500 ± 45
1000	6	500 ± 30

Tabla VII: Relación entre el número de células contadas y el límite de confianza con un nivel de confianza del 95 %. Fuente: IOC.

La metodología seguida durante el análisis cuantitativo ha sido la siguiente:

- En primer lugar, se hace un escaneo de toda la cámara con un aumento bajo, para ayudar a tener una visión general de la densidad y distribución de las células en la superficie. En caso de que la distribución sea desigual habría que desechar la muestra, y agitar mejor el tubo Falcon para romper las agrupaciones de mucosidad.
- A continuación, se puede empezar con el recuento a un aumento de 10X ya que estas microalgas tienen un tamaño de > 20 µm (microplancton). El recuento total del fondo de la cámara se hace por transectos,

cruzando de lado a lado siguiendo las líneas de la base, como se muestra en la figura 11. También se pueden realizar transectos verticales, mientras se tenga en cuenta a la hora de calcular el volumen de líquido analizado. El recuento de parte del fondo de la cámara se puede hacer de muchas formas, desde ir intercalando transectos contados con no contados, a solo fijarse en un transecto situado en el medio, o a contar transectos al azar, pero sin repetirlos.

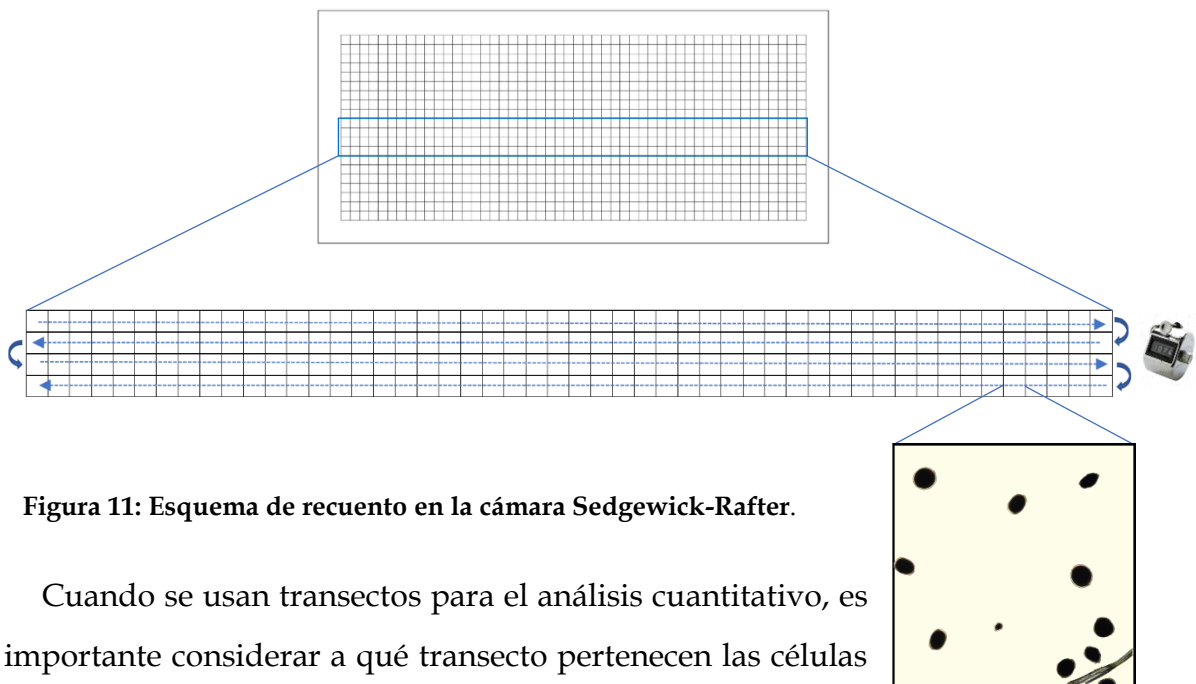


Figura 11: Esquema de recuento en la cámara Sedgewick-Rafter.

Cuando se usan transectos para el análisis cuantitativo, es importante considerar a qué transecto pertenecen las células que se encuentran justo encima de las líneas entre distintas secciones. Una manera fácil es decidir que las células que se encuentren en la línea superior o derecha serán contadas, mientras las que estén en la línea inferior o de la izquierda serán omitidas.

- Una vez obtenidos los datos de número de células y área contada, se calcula la concentración celular con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{células}}{\text{mL}} = \frac{\text{número células contadas}}{\text{número cuadraditos } (\mu\text{L})} \cdot 1000 \mu\text{L/mL}$$

Este dato será necesario para hacer el seguimiento del cultivo, además de poder compararlo con los otros parámetros como la cantidad de clorofila, la evolución de las bacterias y la biomasa.

2. Recuento de bacterias

Tal y como se ha dicho antes, los experimentos se han hecho con un cultivo monoespecífico pero no axénico. Esto conlleva que, a la hora de preparar el cultivo se haya podido contaminar y se hayan podido introducir bacterias marinas. Para poder estudiar la relación entre la evolución del cultivo de *Ostreopsis cf. ovata* y las bacterias, se ha considerado hacer un seguimiento de éstas.

- Método con membrana y epifluorescencia

Para poder analizar la abundancia bacteriana del cultivo no axénico, se determina mediante el método de conteo directo en un microscopio con epifluorescencia. De modo que se recogen 2.5 mL de muestra y se le añade un marcador fluorescente.

Previamente, hay que preservar la muestra con glutaraldehído al 10%. El volumen de la sustancia fijadora tiene que ser el 1% del volumen final. Después, se ponen las muestras en la nevera al menos durante una hora y no más de 24 horas, a 4°C para que se incuben las muestras.

La preparación de los filtros se hace en un sistema de filtración de torre, con una rampa de filtración que contiene un motor que va bombeando aire. Las muestras se pasan por un filtro negro de membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 0.2 μm y se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) específico para DNA, durante 5 minutos. Una vez el filtro está seco, se ponen en un portaobjetos, se le añade una gota de aceite de inmersión entre éste y el filtro, y entre el filtro y el cubreobjetos adecuado. Se congelan los portaobjetos ya montados a -20°C para su correcta conservación.

En el momento de observar el filtro colocado en el portaobjetos con el microscopio de epifluorescencia, se añade una gota de aceite de inmersión para mejorar la resolución del microscopio. Se observa un mínimo de 8 campos microscópicos y se marca también un mínimo de 250 bacterias. Los campos se

distribuyen aproximadamente tal y como se muestra en la imagen, representados con una lupa roja). En cada campo microscópico se cuentan solo las bacterias de una fila, la primera fila del micrométrico ocular, debido a su alta densidad.

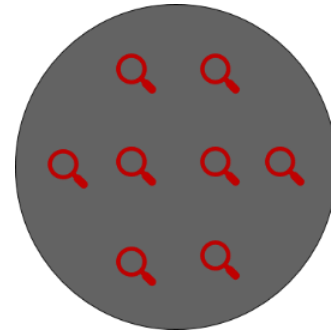


Figura 12: Esquema del filtro con las bacterias. Las lupas rojas equivalen a los 8 campos analizados.

Para obtener la cantidad de bacterias por cada filtro se realizan los siguientes cálculos:

- 1) Se encuentra el factor mediante la siguiente fórmula, siendo la superficie observada equivalente a la línea de la cuadrícula microscópica de 10 cuadritos de 0.1 mm cada uno, y el radio del filtro donde se recoge la muestra de 10.5 mm.

$$\frac{\text{Superf. filtro}}{\text{Superf. observada}} = \frac{\pi \cdot r^2}{\text{superf. una línea}} = \frac{\pi \cdot (10.5)^2}{0.1 \text{ mm} \cdot 0.01 \text{ mm}} = 346360.59 = \text{factor}$$

- 2) Una vez calculado el factor, se puede calcular la cantidad de bacterias por filtro según la siguiente expresión:

$$\frac{\text{bacterias}}{\text{filtro}} = \frac{\text{n}^\circ \text{ bacterias}}{\text{líneas contadas}} \cdot \text{factor}$$

De este modo, se estima las bacterias totales por mL filtrado y obtener información para poder estudiar la relación entre el crecimiento de células de *Ostreopsis* cf. *ovata* y las bacterias. Las bacterias se benefician de la microalga creciendo a expensas del *mucus* rico en materia orgánica.

3. Análisis de la clorofila

Una manera de estudiar cómo de adaptados están los dinoflagelados bentónicos a la luz es examinando la composición de los pigmentos, como la clorofila a. En la fase previa, se recogen 10 mL de cultivo en filtros de fibra de vidrio de tipo GF/C (tamaño nominal de 1.2 μm). Los filtros se conservan en el congelador a -20°C de temperatura.

Para realizar la extracción de las muestras, se sumerge cada filtro en 6 mL de acetona al 90%, y se deja actuar durante 24 horas en la nevera. Tienen que estar protegidos de la luz directa durante su manipulación y durante el tiempo de reposo, para evitar la degradación de la clorofila.

Al día siguiente, se analizan los extractos con el fluorómetro, 10AUTM Fluorometer (Turner Designs). Si los filtros están muy deshechos, se centrifugan las muestras (5 minutos a 4°C i 4500 rpm) para que los restos del filtro precipiten y no queden en suspensión en el tubo de ensayo que se introduce en el fluorómetro. Es importante utilizar un patrón sólido para comprobar la estabilidad del fluorómetro. El patrón sólido consiste en un cilindro que contiene una sustancia fluorescente, se trata de un extracto puro de clorofila comercial. Se mide su emisión en los rangos Low y High del fluorómetro. Estos valores deben mantenerse dentro de unos rangos establecidos por el fabricante. Antes de añadir las muestras, también se introducen 3 blancos.

Una vez recopilados los datos de la lectura de fluorescencia total se calcula la cantidad de clorofila según la fórmula:

$$\frac{\mu\text{g}}{\text{L}} = (\text{fluorescencia} - \text{blanco}) \cdot \text{factor} \cdot \left(\frac{\text{extracto (mL)}}{\text{volumen filtrado (L)}} \right)$$

4. Volumen celular

Otra estimación de la biomasa se obtiene midiendo el volumen celular, que es proporcional al carbono. Además, en el caso de *Ostreopsis*, el volumen celular varía según las formas de vida, las cuales a su vez varían según la fase de crecimiento.

Para obtener estos datos, se fotografían las células de las muestras mediante una cámara integrada en el microscopio invertido. Se va combinado el campo claro con la luz ultravioleta (epifluorescencia) para poder identificar cada célula (Explicación en el siguiente apartado: Categorización celular de *Ostreopsis*).

La toma de fotografías se hace con el ordenador conectado al microscopio. Primero se hace un barrido de toda la columna de sedimentación de 2 mL y a continuación, se van fotografiando las células seleccionadas, de manera que sean representativas de las diversas morfologías o formas de vida a estudiar.

Después se tratan las fotografías con un programa (ImageJ) tal y cómo se muestra en las figuras 13 y 14, dónde obtenemos:

- La superficie (S) exacta de la célula, en base a su perímetro seleccionado mediante una de las herramientas del programa.
- El diámetro dorsoventral (DV), que en vista apical es equivalente a la distancia entre la parte ventral y la dorsal, corresponde a la longitud de la célula.
- El transdiámetro (W) que en vista ventral es la distancia entre las dos partes más externas del cingulo, equivaldría al ancho de la célula.

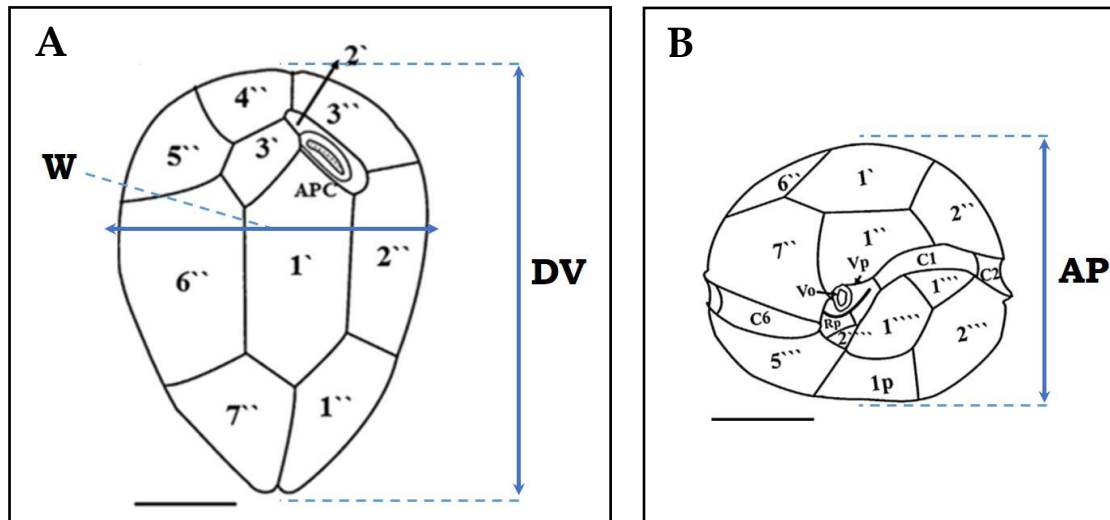


Figura 13: Dibujos de *Ostreopsis cf. ovata* con DV, W y AP señalados. (A) Vista apical con el complejo del poro apical (APC). (B) Vista ventral con abertura ventral (Vo), placa ventral (Vp), placa con cresta (Rp) y cingulo (C1, C2, C6). Escala de las barras= 5 μ m. Fuente: Dibujos de Kang *et al.* (2013).

Para obtener el volumen del organismo, es necesario conocer la tercera dimensión, es decir, el grueso de la célula, correspondiente al diámetro anteroposterior (AP). Existen estudios que estimaron el AP con la ayuda de una aguja levantando las células (Accoroni *et al.*, 2012a). Nosotros no realizamos esta manipulación de la muestra, por lo que nuestras estimaciones del AP se basan en los estudios morfométricos, donde se indica la relación media obtenida entre DV/AP. Por consiguiente, estimamos AP en función a nuestros valores de DV. Previamente, comprobamos que la superficie obtenida con el programa correspondía con la superficie teórica, asumiendo la forma de *Ostreopsis* como la de un elipsoide (Hillebrand *et al.*, 1999), donde la superficie de una elipse es:

$$S = \pi \cdot r_1 \cdot r_2 = \pi \cdot \frac{(DV \cdot W)}{2}$$

Una vez obtenidos los valores de la superficie y el AP, se calcula el volumen celular con la siguiente fórmula de la figura geométrica de un elipsoide:

$$V = \frac{4}{3} \cdot S \cdot r_3 = \frac{4}{3} \cdot S \cdot \frac{AP}{2}$$

El uso de formas geométricas y ecuaciones matemáticas, facilitan y minimizan el esfuerzo de medición en el microscopio.

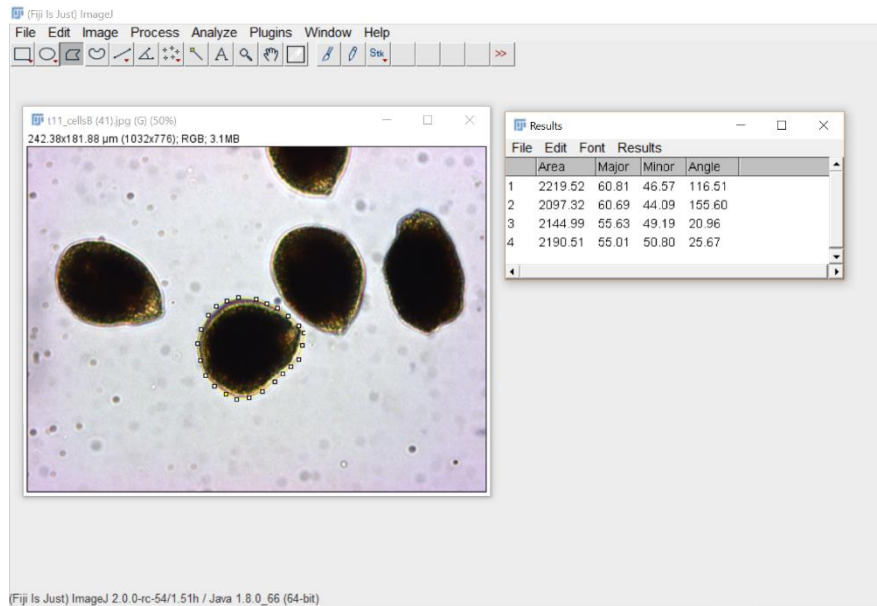


Figura 14: Captura del programa ImageJ. Se utiliza para determinar el tamaño celular de *O. cf. ovata*.

Todos los datos morfométricos recopilados se presentan como: media (\bar{x} o *avg*) \pm error estándar (ϵ o *SE*).

Antes de analizar las fotografías con el programa, hay que calibrar el microscopio para determinar la equivalencia en píxeles y micras. Mediante un portaobjetos micrométrico, se fotografía y así se puede obtener el número de píxeles exactos que representan una unidad de micra, este proceso se repite con cada uno de los objetivos del microscopio. Una vez calculada la escala, se inserta en el programa analítico y ya se pueden calcular los datos de tamaño celular y la superficie exacta, gracias a las herramientas disponibles.

- Alternativa al análisis manual: contador Coulter automatizado

Un contador Coulter es un aparato que sirve para contar y medir el tamaño de las partículas suspendidas mediante el uso de técnicas electrónicas y ópticas. Normalmente, posee uno o más microcanales que conectan a dos cámaras que contienen una solución electrolítica. Al aplicar una diferencia de potencial, se

induce a que la solución fluya de una cámara a otra. Cuando las células en suspensión atraviesan el microcanal provocan un breve cambio en la resistencia eléctrica del líquido que el contador detecta. De este modo, calcula el número de células y la talla del cambio de la corriente eléctrica, que se relaciona con la talla de la célula. Este instrumento desempeña la función de un análisis rápido, que en algunos casos puede sustituir el recuento a mano bajo un microscopio.

En el ICM disponen de un contador Coulter, con una apertura del tubo de 100 μm y un intervalo de tamaño efectivo de partícula de 2 - 60 μm (diámetro equivalente esférico). Por lo tanto, en lo que hace referencia a tamaño celular, sería posible analizar células de *Ostreopsis*, aunque en nuestro caso, no fue factible el uso de este instrumento debido a las características del cultivo y las limitaciones existentes. Para analizar una muestra con el Coulter tiene que ser una muestra viva, que no esté fijada. Además, hay que disponer de un volumen elevado de muestra, ya que este instrumento necesita analizar una cantidad considerable de solución. Las células que identifica y analiza el Coulter tienen que ser esféricas. Pero la principal limitación es que las células no pueden formar agregados: ello imposibilita completamente el recuento del número y la medida del volumen. En nuestro caso, la microalga se agrupa formando mucosidades por lo que imposibilita este tipo de análisis automatizado.

5. Categorización celular de *Ostreopsis*

En los dinoflagelados, los ciclos de vida son complejos e incluyen fases vegetativas (o asexuales), sexuales y quistes, con formas y tamaños diferentes. En los estudios fisiológicos, es importante conocer las formas de vida y sus tamaños en cada fase del cultivo.

En nuestros experimentos se quiere caracterizar las fases celulares de *Ostreopsis*, para la cual se realizan al menos 50 fotografías de cada muestra y se analizan para obtener las formas y tamaños celulares. Cada fotografía tendrá de una a tres células, dependiendo de la separación entre ellas. Las fotografías que se analizan están tomadas a un aumento de 20X.

Las formas vegetativas cubiertas con celulosa se visualizan mediante tinción con calcofluor, un fluorocromo específico para este componente. En cambio, los quistes tienen un recubrimiento diferente y no se tiñen con el calcofluor.

Primero se añade el tinte de fluorocromo (blanco de calcofluor M2R, fórmula química: $C_{40}H_{42}N_{12}O_{10}S_2Na_2$). Esta sustancia química se obtiene mezclando 2 μ g calcofluor en 10 mL de agua destilada en una botella de vidrio limpia (concentración de 10 mg/mL). Hay que tener en cuenta que la intensidad de la epifluorescencia depende del pH, por este motivo, en muestras ácidas el calcofluor precipitará y la epifluorescencia será menor o prácticamente nula.

Se añaden de 1-4 gotas como máximo de la sustancia abrillantadora a cada muestra para clasificar las células del cultivo de *Ostreopsis* cf. *ovata*. Las gotas de calcofluor se disuelven rápidamente en la muestra y cuando la muestra está homogenizada en la placa Sedgewick-Rafter ya se puede analizar.

Cuando la teca de la microalga presenta un color azul intenso, es porque el calcofluor ha reaccionado con la celulosa y la luz ultravioleta. Tanto las tecas sueltas como las tecas de las células vegetativas sanas reaccionan con el calcofluor emitiendo un color azul vivo. Asimismo, se pueden apreciar con una gran claridad las suturas de las placas y los poros. Por lo que es un buen método para observar los detalles de la teca, su disposición y los poros que tienen las placas. Los quistes y células muertas que han perdido la pared celular no reaccionan con el calcofluor, por lo tanto, cuando se observe con la luz UV, la célula quedará oscura sin distinguirse del fondo.

La metodología empleada para categorizar las distintas formas celulares ha sido mediante la combinación de luz blanca y la aplicación de la luz UV, en el mismo microscopio. De modo que con la luz blanca se visualiza la célula teñida con lugol, y al cambiar a la luz ultravioleta se visualiza la teca teñida de azul, si no se tiñe la célula entonces es un quiste.

3.6. Instrumentos

Este apartado hace referencia a los microscopios utilizados durante el estudio de los distintos parámetros y los programas empleados para el análisis de los datos.

3.6.1. Microscópico óptico

Para poder identificar y enumerar las especies de fitoplancton es necesario un microscopio de calidad, ya sea un microscopio óptico estándar o un microscopio invertido. El microscopio invertido, como bien dice su nombre, tiene la estructura invertida en comparación al microscopio convencional. Los objetivos están debajo de la platina que sostiene la muestra. Es necesario hacer uso del invertido con las muestras que necesitan cámaras de sedimentación y frascos donde las células de fitoplancton se depositan al fondo, como los de nuestro estudio. Las observaciones micrométricas de las células y recuentos fueron mediante microscopios invertidos de campo claro, en concreto los modelos: Leitz DMiL, Leica DMi1, Nikon Diaphot 200 y Axiovert 35. En concreto, el microscopio Nikon Diaphot 200, es el que se utilizó para fotografiar las células y poder obtener el volumen celular (biomasa) al tener una cámara fotográfica integrada.

3.6.2. Microscopía de epifluorescencia

La microscopía de epifluorescencia es un método muy efectivo para mejorar la detección e identificación de ciertos organismos. Por ejemplo, la clorofila presente en los dinoflagelados tiene autofluorescencia y con luz ultravioleta reaccionan emitiendo un color rojo intenso.

Un método muy común es inducir la epifluorescencia mediante el uso de fluorocromos adecuados para cada muestra según lo que se quiera destacar para su observación y estudio.

Como es el caso de los organismos con pared celular de celulosa, que mediante un fosforescente abrillantador se contempla con mucha facilidad las estructuras que presentan este polisacárido.

El microscopio debe estar equipado con el material de epifluorescencia y los lentes tienen que ser óptimos para la microscopía de fluorescencia. En este trabajo se han usado los microscopios: Olympus BX40 y Nikon Diaphot 200. Ambos equipados con una lámpara de mercurio a alta presión de 200 V, filtros para el DAPI (excitación UV de 330-380 nm) y filtros de emisión.

El modelo Nikon Diaphot 200, es un microscopio invertido que se usa combinando la luz blanca con la ultravioleta para la caracterización celular.

3.6.3. Análisis de datos

Los resultados obtenidos de los diferentes parámetros estudiados se almacenan en hojas de cálculo Excel, tanto para facilitar su representación gráfica en este mismo programa o con el KaleidaGraph, como para la comparación de las distintas variables y su posible interrelación.

Por otro lado, el análisis estadístico se realiza con el mismo KaleidaGraph y el programa estadístico Minitab Express, que permite realizar los test estadísticos necesarios.

Se comprueba si los datos obtenidos del tamaño celular son representativos entre sí. Por lo que se verifica si cada variable sigue una distribución normal, realizando el test de la normalidad. Para determinar si los resultados siguen esta distribución, se comparan los resultados del “valor p” con el nivel de significación alfa. Este valor es de 0.05, por lo tanto, si el valor $p \leq \alpha$, los datos no siguen una distribución normal, en cambio si el valor $p > \alpha$, entonces no se puede concluir que los datos no siguen una distribución normal.

Después para poder comparar los valores de los tres tiempos, se ejecuta el test de Mann-Whitney para ver si existen diferencias significativas entre las distintas

fases del cultivo. El programa que realiza el test analiza las diferencias entre las medianas de las muestras, con el intervalo de confianza alcanzable más cercano a 95%.

Para fotografiar las células se usa el programa BTV Pro y para el análisis de las imágenes se usan los programas ImageJ y GIMP.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A lo largo de este apartado se exponen los datos obtenidos durante los tres experimentos. Además, se analizan y representan gráficamente para facilitar su interpretación y poder sacar conclusiones.

Primero, se presentan los resultados del experimento de la preparación del muestreo, realizado para comprobar qué tipo de muestreo resulta más eficiente. A partir de éste se diseñan los siguientes experimentos.

Después, se muestran los resultados obtenidos en el segundo experimento, considerado como el experimento preliminar. Los errores de manipulación originados en éste servirán para perfeccionar el tercer experimento, que será el más completo.

Por último, se exponen los datos del último experimento, el experimento avanzado. Se analizan todos los parámetros bioquímicos de nuestro dinoflagelado, el volumen y las formas de vida en función a su estado fisiológico. También, se realiza una comparación de los experimentos preliminar y avanzado, y datos de otros artículos con los expuestos en este trabajo. Además de los gráficos, se añaden fotografías para apreciar las distintas morfologías celulares.

4.1. Experimento 1: Preparación técnicas de muestreo

Este experimento previo se realiza dos días antes de empezar el segundo experimento. Desarrollando este experimento se prueba el tipo de manipulación adecuada al muestrear, por este motivo lo llamamos: preparación de la técnica muestreo o *mixing experiment* ya que el principal aspecto a evaluar es cómo la agitación de los frascos permite obtener muestras representativas de la población celular.

Nuestro cultivo genera agregados a partir de la producción de mucílago. Ello constituye una limitación, pues conlleva errores al tomar las muestras que resultarán en errores en los parámetros estimados.

La recogida de muestras de los frascos Fernbach que contienen el cultivo en fase exponencial, el día (28/06/2016) del frasco #2 y el día (29/06/2016) del frasco #1, se hacen de la siguiente manera:

- 1) Sin mezclar los frascos, *no mixing*, moviendo la pipeta suavemente cubriendo distintos puntos del frasco.
- 2) Agitando suavemente los frascos, *gentle mixing*, moviendo radialmente la pipeta (como se haría si estuviéramos agitando la muestra antes de ser analizada mediante el contador Coulter y aspirando inmediatamente la muestra.
- 3) Agitando vigorosamente (disgregando), *well mixing*, el frasco.

Se recogen tres réplicas de cada modalidad de muestreo. Las muestras se guardan en tubos de Falcon con el fijador (lugol) y se conservan a temperatura ambiente en un lugar donde no les toque la luz directa. Cuando se hace el recuento con la técnica Sedgewick-Rafter se obtienen los siguientes datos, representados en la figura 15.

Tal y como se aprecia en el histograma, existe una clara influencia en el modo en que se maneja el frasco para la toma de muestras. Las células de *Ostreopsis cf. ovata*, se encuentran adheridas a la mucosidad que ésta forma. Así que, al no

mezclar el frasco, el *mucus* no se disgrega, y si al pipetear no se coge ningún grumo, la presencia de células dispersas en el agua es menor. Cuando se agita el frasco de manera suave, se observa cómo se recoge más cantidad de células, ya que algunos de los agregados se rompen. Y al agitar vigorosamente, los agregados se rompen considerablemente, con más presencia de células “libres”. De modo que, consideramos este método más óptimo y representativo para determinar el número de células existentes en el cultivo.

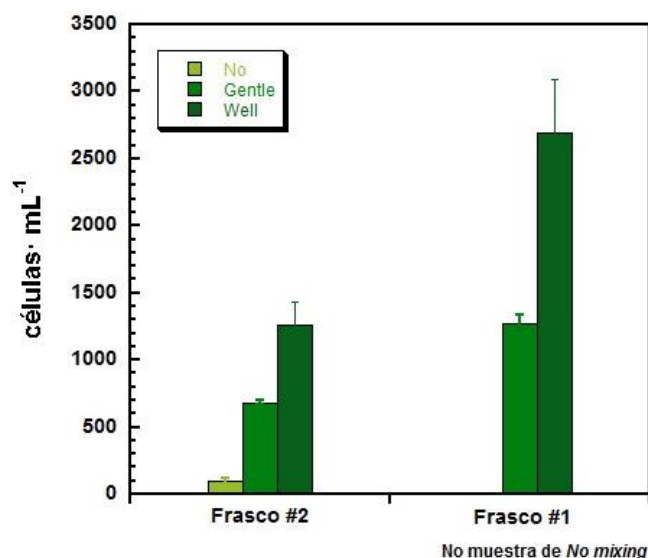


Figura 15: Histograma experimento 1, *mixing experiment*. Verde claro: datos obtenidos de los frascos sin agitar, el verde intermedio: se han agitado suavemente y el verde oscuro: frascos se agitan vigorosamente. Las barras de error representan la variabilidad entre las tres réplicas.

En conclusión, con este experimento previo, se demuestra que la toma de muestras más adecuada debe hacerse agitando bien el frasco y de forma radialmente, pero a la vez con delicadeza para provocar un impacto mínimo a la población. Es decir, agitar vigorosamente para disgregar los grumos de *mucus*, pero con cautela para evitar romper las células.

4.2. Experimento 2: Preliminar

Este segundo experimento es considerado preliminar, ya que cuando se obtienen los datos y se representan, no se obtiene una curva exponencial típica

del cultivo (como se comentará a continuación). Además, sirve para mejorar los errores de manipulación en el siguiente experimento.

Los objetivos del experimento preliminar es hacer un seguimiento de las células de *Ostreopsis cf. ovata* y de la cantidad de clorofila presentes. También se quiere estimar la abundancia bacteriana, ya que se considera que las bacterias se encuentran adheridas al mucílago.

Asimismo, se quiere comprobar la variabilidad relacionada con los grumos tanto en el frasco de cultivo como en el recuento de la muestra fijada. Se consideran dos modos de recoger y pipetear la muestra del frasco: uno es sin agitar el frasco, pipeteando suavemente, procurando no coger ningún grumo de mucílago para poder estimar las células suspendidas y libres en el agua, estas muestras se llaman *Free*, es decir las que se encuentran en la fracción libre, fuera de los agregados. El otro modo, es agitando el frasco vigorosamente como se ha dicho en el experimento anterior, al agitar, los grumos de mucílago se habrán disgregado, a estas muestras las nombramos *Total*.

La recogida de muestras de los frascos #1, #2 y #3 para los distintos parámetros durante el período del 30/06/2016 al 12/07/2016, se hace del siguiente modo:

- Para el seguimiento de células de *Ostreopsis*, se toman entre 5-10 mL de cultivo sin agitar (*Free*) que se fijarán con lugol, y otros 2.5 mL en otro tubo para el seguimiento de la evolución de las bacterias (se fijarán y filtrarán posteriormente).
- Después, se agita el frasco vigorosamente y se recoge aproximadamente unos 5-10 mL de muestra en un tubo para la estimación de las células totales (*Total*) y otros 10 mL para filtrar posteriormente y estimar la clorofila total.

A continuación, se muestra en la tabla VIII, las fechas del muestreo y el tiempo del cultivo que le corresponde. El cultivo madre es inoculado en los tres frascos el 30 de junio, que corresponde al tiempo inicial (t_0).

Fecha	Tiempo	Fecha	Tiempo
30/06/16	0	06/07/16	6
01/07/16	1	07/07/16	7
03/07/16	3	08/07/16	8
04/07/16	4	11/07/16	11
05/07/16	5	12/07/16	12

Tabla VIII: Duración experimento 2. Asignación de cada fecha con el tiempo correspondiente.

4.2.1. Seguimiento celular

Los datos obtenidos en este experimento se representan en varias gráficas. En ellas, se aprecia la evolución de los diferentes parámetros del cultivo de *Ostreopsis cf. ovata* a lo largo del experimento.

Los dos gráficos de la figura 16 representan la evolución del cultivo en cuanto al número de células. En el de la izquierda se representa la cantidad total de células durante los tiempos ($t_0 - t_{12}$) presentes en cada frasco, estimada en las muestras obtenidas agitando vigorosamente, ya que se disgregan los grumos. En el de la derecha se observa la cantidad de células libres (no agregados) en el agua del frasco, la fracción *Free*.

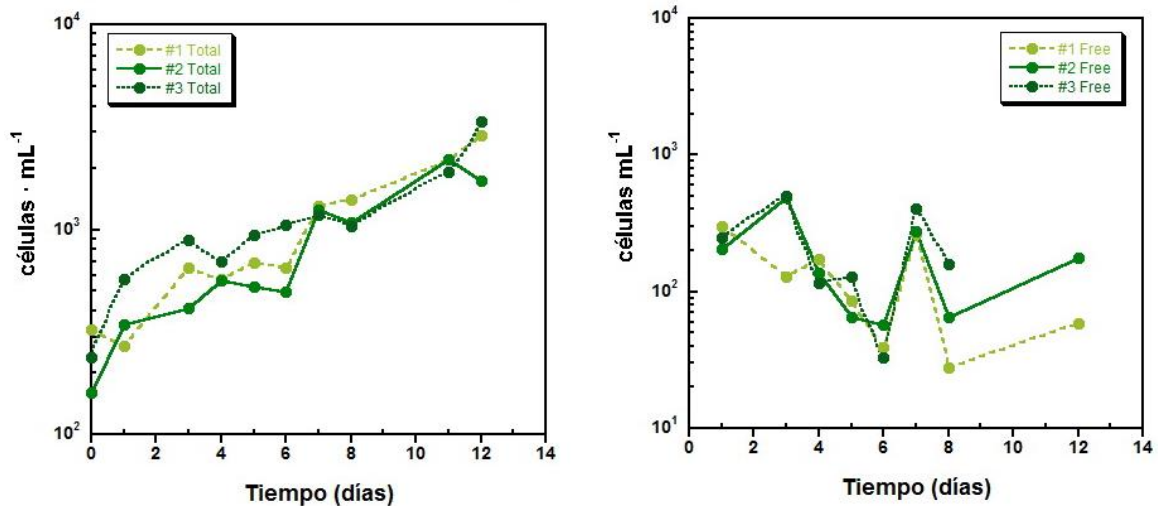


Figura 16: Evolución del número de células del experimento 2. Gráfico de la izquierda evolución de los 3 frascos de las muestras *Total*, gráfico de la derecha evolución de los 3 frascos de las muestras suspendidas, *Free*.

Los tres frascos presentan una tendencia similar, aunque con una cierta variabilidad, a pesar de tener los 3 frascos bajo las mismas condiciones de temperatura, luz, medio y nutrientes.

Señalar que en la curva de células *Free* del frasco #3, no hay muestra del día 12/07/2016, correspondiente al tiempo 12.

Al juntar los dos gráficos y representarlos con la misma escala logarítmica, se ve una clara diferencia entre las células suspendidas y las totales. Se muestra la media de ambas modalidades con las barras de error correspondientes (figura 17).

Los datos de las muestras *Free* son muy variables, no siguen una tendencia clara. Este hecho podría darse debido a la alta variabilidad que implica coger o no un agregado de células, con mayor o menor cantidad de células adheridas. Por ejemplo, en el tiempo 6 hay 43 ± 7.2 células/mL, en el tiempo 7 hay 314.3 ± 43 células/mL y el día siguiente (tiempo 8) se estiman 83.3 ± 38.4 células/mL. Estos cambios en la concentración del cultivo en tan solo 24 - 72 horas, están condicionados por el hecho de que haya caído o no un agregado de células.

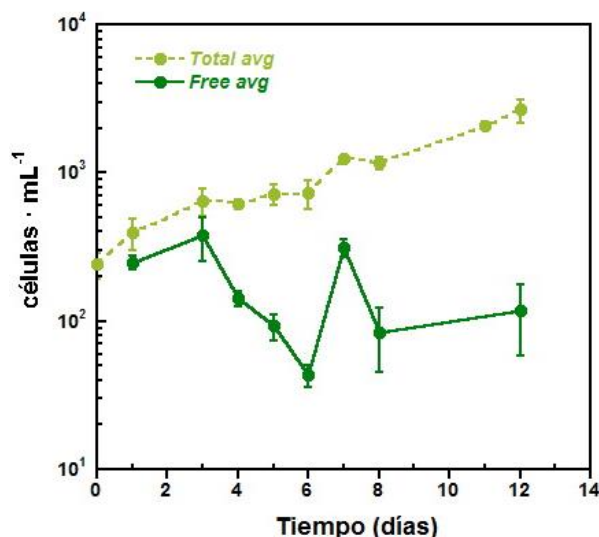


Figura 17: Evolución de las medias de *Ostreopsis* del experimento 2. Medias de los tres frascos tanto de los datos *Total* como los *Free*.

En conclusión, hay pocas células “libres” o en suspensión, la mayoría forman agregados mediante el mucílago, lo cual explicaría que si éstos no están bien disgregados (mediante la agitación) la curva de crecimiento presenta estas oscilaciones tan marcadas.

Por lo que respecta a la curva de crecimiento de las muestras de la fracción *Total*, obtenidas después de agitar bien los frascos, se observa una tendencia constante de crecimiento, aunque poco típica. No se ve un crecimiento exponencial bien definido, pues crece hasta el día 3, luego se detiene hasta el día 6, para continuar de nuevo el crecimiento exponencial hasta el final del experimento. Esta tendencia sugiere que el cultivo no estaba suficientemente adaptado a las condiciones experimentales.

4.2.2. Seguimiento bacteriano

Del mismo modo, se estudia la evolución de las bacterias presentes en el cultivo. Al tratarse de un cultivo monoespecífico pero no axénico, conlleva la presencia de otros organismos como las bacterias marinas que se hayan podido introducir al aislar la célula madre desde la población natural de *Ostreopsis* y/o posteriormente durante la manipulación del cultivo. Como las bacterias van a

crecer a partir de la materia orgánica excretada por *Ostreopsis* y también van a competir por los nutrientes inorgánicos del medio f/2, es importante conocer la evolución de las bacterias a lo largo del cultivo (fig. 18).

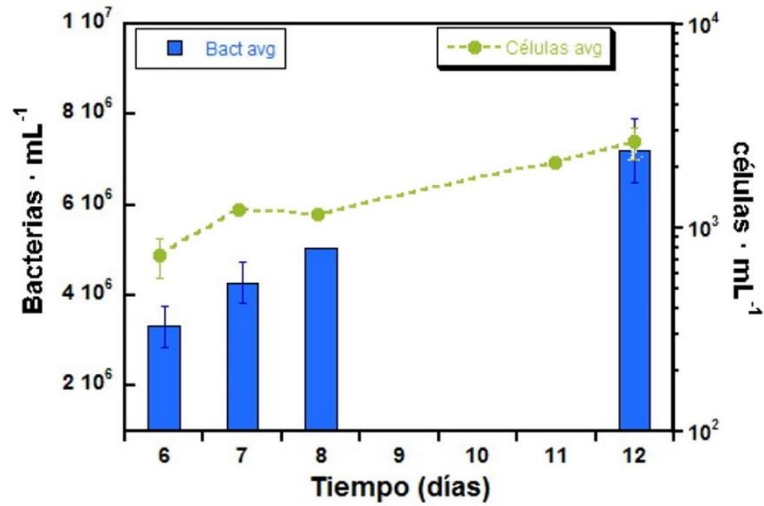


Figura 18: Evolución de la concentración de bacterias y número de células a lo largo del experimento 2. La media del número de células de *Ostreopsis* es el de la fracción *Total*.

La cantidad de bacterias va aumentando en paralelo al número de células de *Ostreopsis*. Parece que podría haber una dependencia de las bacterias por la producción de *mucus* que desprenden las microalgas. El mucílago se caracteriza por su estructura compleja, formada por una red de numerosos tricocistos¹ incrustados con filamentos de polisacáridos ácidos, secretados a través de los poros de la teca (Giussani *et al.*, 2015). Forman una matriz extracelular muy resistente, común en otras especies de dinoflagelados. El papel que juega el mucílago en estas microalgas es de gran importancia, su volumen es difícil de estimar, pero existen estudios sobre la función del *mucus* y sus implicaciones en la toxicidad de *Ostreopsis* en relación con otros organismos (Honsell *et al.*, 2013; Giussani *et al.*, 2015).

En la figura 19 se pueden ver las células junto con el mucílago que ellas mismas producen. Mediante el uso de microscopio de contraste de fase se puede observar cómo son los agregados y cómo están adheridos a la red de filamentos. Las

¹ Tricocisto: Órgano evaginable que dispara un filamento como método de defensa o para anclar el alimento.

células se encuentran ancladas a los filamentos por la parte ventral, siendo capaces de hacer movimientos rotatorios alrededor del punto de unión (Honsell *et al*, 2013).

Cuando esta microalga comparte el medio con otros organismos, también se encuentran adheridas a la red de filamentos, como las bacterias en nuestro caso, o las diatomeas en muestras de campo.

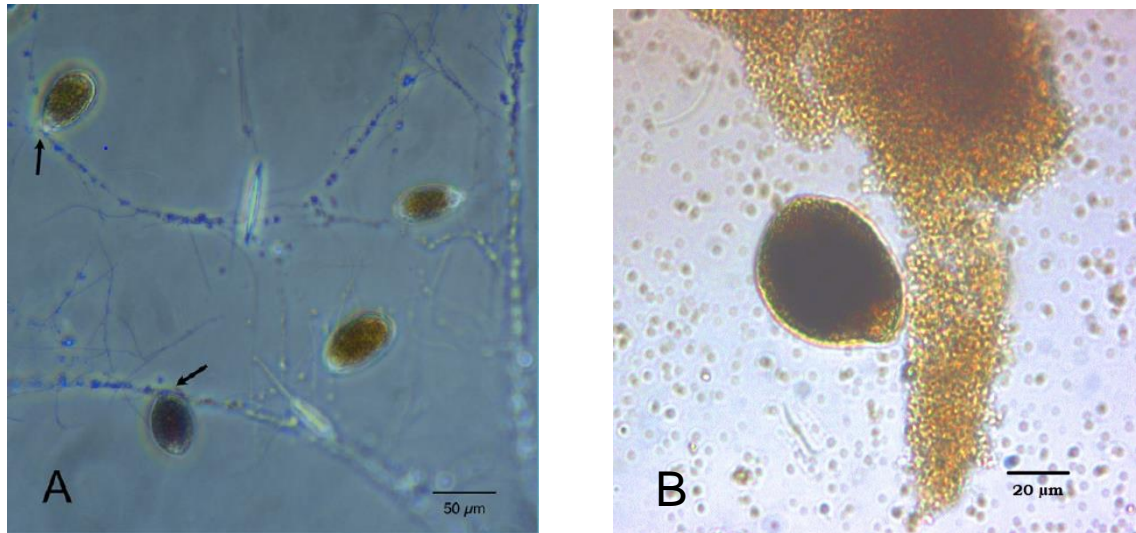


Figura 19: Red de mucus de *Ostreopsis cf. ovata* con microscopio óptico. (A) Células adheridas a la red de filamentos, normalmente, están ancladas por la parte ventral (flechas). Escala de la barra= 50 µm. Fuente: Honsell *et al*. (2013). (B) Célula de *O. cf. ovata* junto con un grumo de mucílago en nuestro experimento. Escala de la barra= 20 µm. Fuente: Elaboración propia.

O. cf. ovata produce cantidades copiosas de mucílago, que juegan el papel de unir los organismos a las distintas superficies y sustratos, formando películas transparentes que pueden llegar a incluir muchas células. Sus funciones son diversas, para defenderse de los depredadores (*grazing*), incrementar la flotabilidad e incluso sirve para autorregular el metabolismo excretando excesos de carbono cuando puede haber una deficiencia de nutrientes inorgánicos (Reynolds, 2007).

4.2.3. Evolución de la concentración de clorofila

Como se ha comentado anteriormente, la variable “número de células”, no es la más adecuada para representar el aumento de la biomasa (carbono) de los microorganismos puesto que el tamaño de las células puede variar y por tanto la cantidad de carbono. En el caso de los organismos fotosintéticos, para caracterizar mejor la evolución de la biomasa se usa la variable “clorofila”. La concentración de clorofila es también un parámetro más integrado, en el sentido de que la muestra se recoge en un filtro y no tiene los errores asociados a la manipulación posterior que implica estimar el número de células al microscopio (como se ha explicado).

Tal y como se muestra en la figura 20, donde se puede apreciar la evolución del cultivo, la línea verde oscura (clorofila) tiene un crecimiento exponencial más claro en comparación a la línea de número de células totales. Por este motivo, en este caso, para calcular la tasa de crecimiento lo asociamos a la variable clorofila.

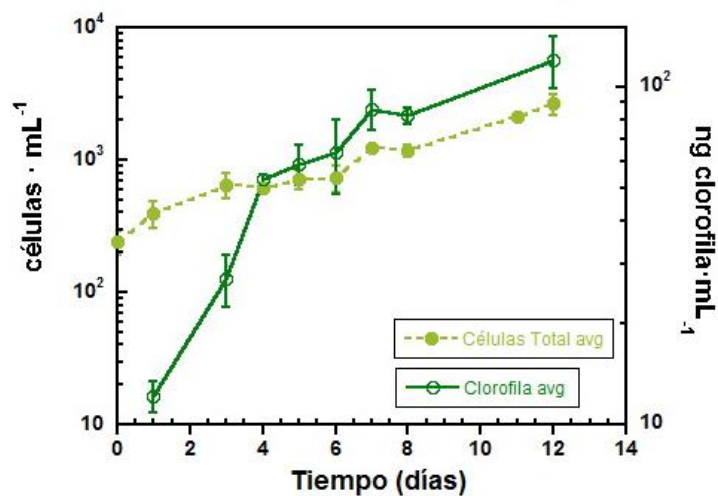


Figura 20: Relación entre *Ostreopsis* y la clorofila del experimento 2. Ambas líneas son las medias de cada parámetro.

Para ello, primero se representan los datos en función del tiempo en escala logarítmica para identificar las fases de crecimiento, en nuestro caso se usarán los valores de los tiempos 1, 3 y 4, ya que durante estos días el cultivo estaba en plena fase exponencial.

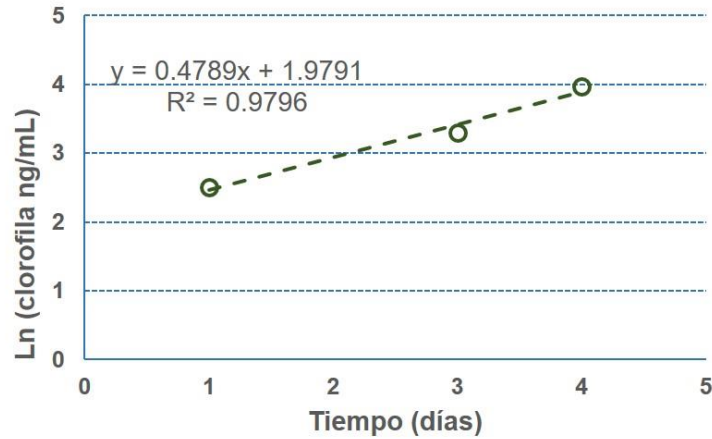


Figura 21: Cálculo de la tasa crecimiento a partir de la clorofila del experimento 2. Se calcula el logaritmo neperiano de la media de la clorofila y se representa en función al tiempo.

La tasa de crecimiento (μ) es la pendiente de la recta del logaritmo neperiano de los datos de clorofila por mililitro, y equivale a 0.479 días^{-1} . Su tasa de duplicación es de 0.691 duplicaciones por día. Y el tiempo de duplicación es de 1.447 días.

También se estima la cantidad de clorofila por célula en picogramos de clorofila por célula, y se obtiene la siguiente representación gráfica de la media (*avg*) de los datos. Las barras de error marcan la diferencia entre las tres réplicas (#1, #2, #3). En el caso del tiempo 6, el frasco #2 presentaba una cantidad de clorofila muy superior a las otras dos réplicas, por algún motivo desconocido.

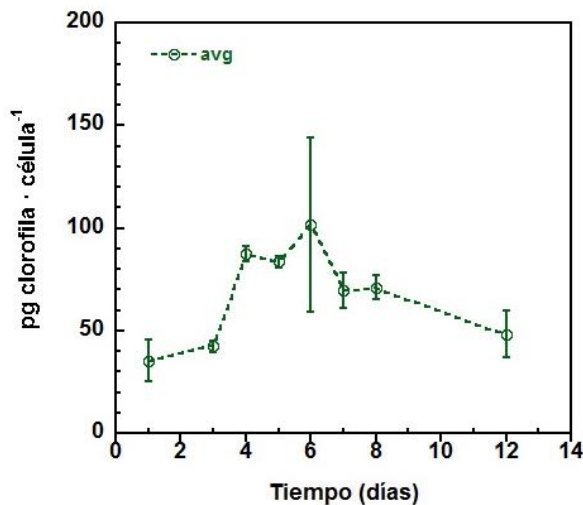


Figura 22: Media de la clorofila por célula del experimento 2.

La evolución de clorofila producida por célula tiene un fuerte crecimiento entre los tiempos 3 y 4, ya que les llega una buena cantidad de luz y disponen de nutrientes. A partir del quinto día, la cantidad de clorofila va disminuyendo, aunque con cierta variabilidad entre los frascos. Esta disminución coincide con la entrada en la fase estacionaria, en los tiempos 4 y 5, probablemente por la limitación de algún nutriente (micronutriente), como podría ser el hierro, elemento fundamental para la producción de clorofila. Pero no se tomaron muestras para comprobarlo, por lo tanto, no se puede interpretar adecuadamente la tendencia de la clorofila por célula.

4.3. Experimento 3: Avanzado

En este último experimento, denominado experimento avanzado, se muestran los datos recogidos de los diferentes parámetros bioquímicos, además de los tamaños celulares y una categorización morfológica de las distintas fases del ciclo de vida de *O. cf. ovata* en cultivo.

Al igual que en el experimento preliminar, se quiere cuantificar el número de células, el número de bacterias y la cantidad de clorofila presentes en el cultivo. Asimismo, se miden y categorizan morfológicamente las células mediante un análisis fotográfico.

También se recogen muestras de las células en suspensión (*Free*), al agitar la muestra y romper las agrupaciones de mucílago, se recogen las muestras homogéneas en el agua (fracción *Total*) del mismo modo que el experimento 2.

La recogida de muestras de los frascos Fernbach #A, #B y #C para los distintos parámetros durante el período del 11/07/2016 al 22/07/2016, se hace del siguiente modo:

- Para el seguimiento de células de *Ostreopsis*, se toman entre 5-10 mL de cultivo sin agitar (*Free*) que se fijarán con lugol, y otros 2.5 mL en otro tubo para el seguimiento de la evolución de las bacterias (se fijarán y filtrarán posteriormente).

- Después, se agita el frasco vigorosamente y se recoge aproximadamente unos 5-10 mL de muestra en un tubo para la estimación de las células totales (*Total*) y otros 10 mL para filtrar posteriormente y estimar la clorofila total.

A continuación, se muestra en la tabla IX el tiempo que corresponde a cada fecha de muestreo. El cultivo madre es inoculado en los tres frascos el 11 de julio, que corresponde al tiempo inicial (t_0).

Fecha	Tiempo	Fecha	Tiempo
11/07/16	0	18/07/16	7
12/07/16	1	19/07/16	8
13/07/16	2	20/07/16	9
14/07/16	3	22/07/16	11
15/07/16	4		

Tabla IX: Duración experimento 3. Asignación de cada fecha con su tiempo correspondiente

4.3.1. Seguimiento celular

El número de células por mililitro estimado en los diferentes tiempos, tanto para el muestreo *Total* como el *Free*, se representan en los siguientes gráficos.

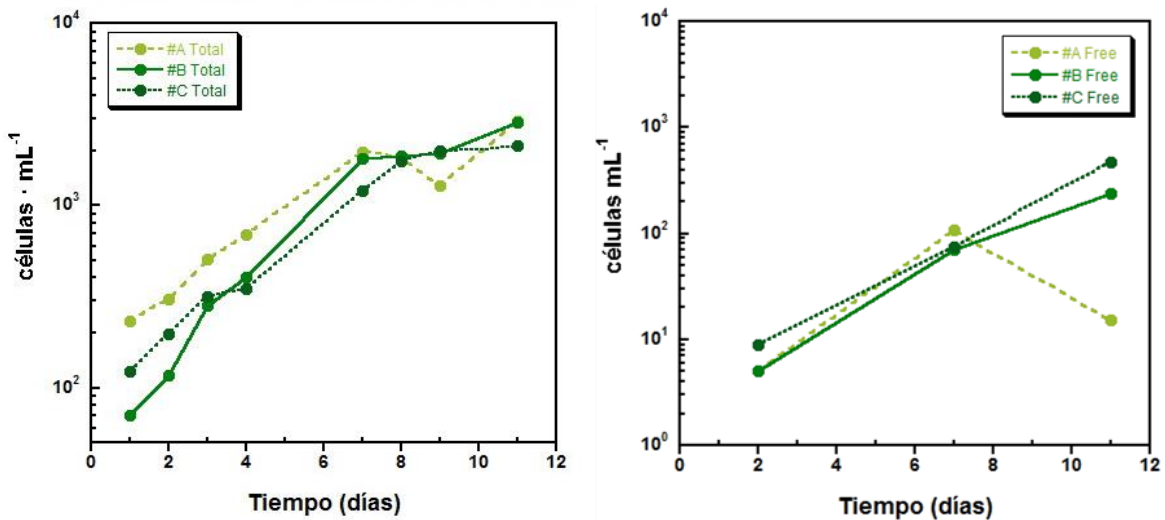


Figura 23: Evolución del número de células del experimento 3. Gráfico de la izquierda evolución de los 3 frascos de las muestras *Total* y el gráfico de la derecha evolución de los 3 frascos de las muestras suspendidas, *Free*.

En el gráfico de la izquierda se puede observar la evolución de las células en el frasco de cultivo, con una clara pendiente exponencial entre los tiempos 1 y 7. A partir del día 8 del cultivo (19 de julio) empieza la fase estacionaria. Por lo que hace referencia a las muestras *Free*, también se percibe un crecimiento exponencial, excepto el frasco #A en el tiempo 11, dónde se ve una fuerte caída de la curva, condicionado a la posibilidad de haber cogido menos células suspendidas al pipetear. De todos modos, estas tendencias deben tomarse con precaución puesto que solo se tomaron 3 muestras.

Al representar las medias (*avg*) de los dos tipos de muestras pipeteadas en la misma escala logarítmica, se aprecia la diferencia entre el número de células suspendidas (*Free*) y las representativas del cultivo (*Total*), siendo estas últimas unas 30 veces mayor, 20 y 10, respectivamente en los tiempos 2, 7 y 11.

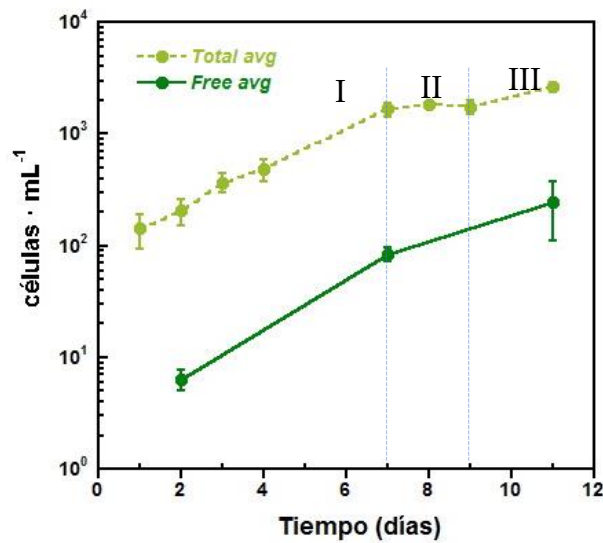


Figura 24: Evolución de las medias de *Ostreopsis* del experimento 3. Valores *Total* y valores *Free*.

En este experimento, la curva del número de células es más representativa y tiene una forma más típica, por lo que se obtiene el valor de la tasa de crecimiento a partir de este parámetro (figura 25). La pendiente de la recta, equiparable a la tasa de crecimiento es de 0.409 días^{-1} . La tasa de duplicación es de 0.591 duplicaciones por día, y su inversa, el tiempo de duplicación es de 1.693 días.

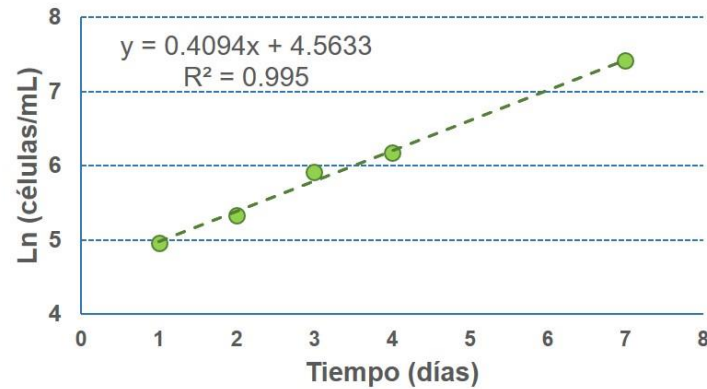


Figura 25: Cálculo de la tasa de crecimiento a partir del número de células del experimento 3. Se calcula el logaritmo neperiano de la media del número de células por mililitro y se representa en función del tiempo.

Del mismo modo, se puede obtener esta tasa a partir de la fórmula planteada por Guillard, 1973 (explicado en el apartado 1.3.3. Dinámica poblacional):

$$\mu = K = K_e = \frac{\ln(C_t / C_i)}{t} = \frac{\ln(1656.65/141.67)}{7 - 1} = 0.409 \text{ d}^{-1}$$

Mediante la fórmula anterior se comprueba el valor de la tasa de crecimiento en este experimento, hallado a partir de la recta de regresión.

4.3.2. Seguimiento bacteriano

Como se ha comentado en el experimento preliminar, existe una relación entre la cantidad de bacterias y la cantidad de *Ostreopsis*, ya que las primeras se benefician de algún modo de la presencia de la microalga.

En la representación conjunta de bacterias y células (figura 26), se observa la alta concentración bacteriana, teniendo en cuenta que la escala de bacterias es lineal y la de células logarítmica. Inicialmente, el cultivo partía de una gran cantidad de bacterias, al iniciarse el período estacionario en el tiempo 7, el número de bacterias decae de 7.20×10^6 (t_2) a 4.47×10^6 bacterias mL^{-1} , tal vez debido a que no tendría suficiente alimento (materia orgánica producida por las microalgas, *mucus*). Luego en el tiempo 11, el número de células vuelve a incrementar, lo que podría implicar que se ha producido un aumento de

producción de mucílago, así que las bacterias también incrementan hasta los 6.58×10^6 bacterias mL^{-1} de media.

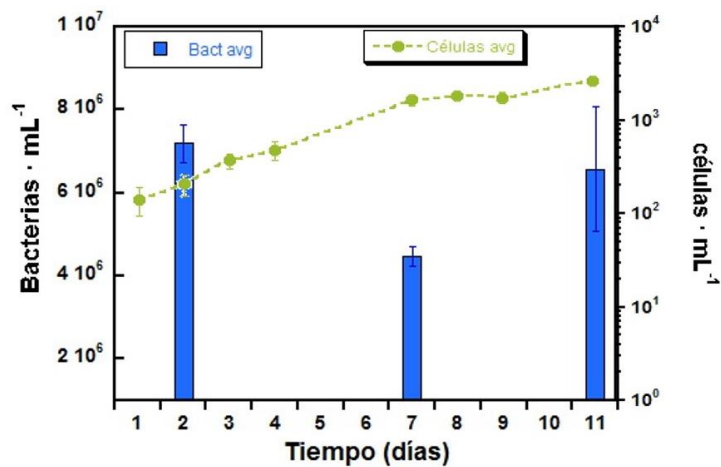


Figura 26: Evolución de la concentración de bacterias y número de células a lo largo del experimento 3. La media del número de células es de la fracción *Total*.

Vanucci *et al.* (2016) estudió la estructura filogenética del conjunto bacteriano que coexiste con el *bloom* de *O. cf. ovata*, comprobando que las interacciones entre las bacterias y la microalga son importantes reguladores durante la dinámica de la proliferación y su toxicidad. En este estudio se investiga la ocurrencia de bacterias en muestras naturales de *O. cf. ovata* del noroeste del mar Adriático durante la fase temprana y en el pico de la floración. Se detectaron en total 14 filos, los más dominante fueron Proteobacteria y Bacteroidetes, y la clase más abundante fue Alphaproteobacteria, tanto en la fase temprana como en el pico.

Algunas bacterias son especialistas en degradar las partículas de materia orgánica y compuestos de gran masa molecular (como la celulosa, quitina y proteínas), especialmente durante el pico con concentración más alta y en la floración temprana (Vanucci *et al.*, 2016).

Es decir, las bacterias acompañantes dependen por un lado de la materia orgánica producida por el fitoplancton, pero por otro lado, son competidoras de los nutrientes inorgánicos (N, P) presentes en el medio. En nuestro caso, al no tener un cultivo puro, era necesario conocer de qué manera crecen las bacterias a expensas del mucílago orgánico que produce.

4.3.3. Evolución de la concentración de clorofila

Los datos de clorofila analizados son de los días 13, 18 y 22 de julio del 2016. Estos tres puntos presentan las características por las que pasa un cultivo en cada fase. Siendo el tiempo 2, la fase inicial al período exponencial, que es cuando hay poca concentración de clorofila por mililitro, es cuando recibe demasiada luz. Después, durante los tiempos 3 y 7 es cuando las células crecen exponencialmente, en el tiempo 7 se da una alta concentración de clorofila y en el tiempo 11 se da la fase estacionaria, tanto de la cantidad de *Ostreopsis cf. ovata*, como de cantidad de clorofila.

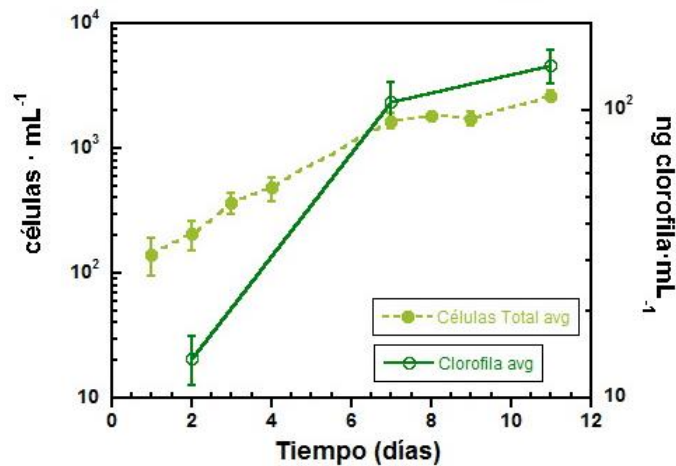


Figura 27: Relación entre *Ostreopsis* y la clorofila del experimento 3. Ambas líneas son las medias (*average*).

La tendencia observada sugiere el efecto de autosombreado en los días 7 y 11 del experimento, pero serían necesarios más días y también realizar medidas de la variación de la luz en el medio de cultivo para comprobarlo. El concepto de autosombreado (*shelf-shading* en inglés), hace referencia a la atenuación de la intensidad de luz debido a la presencia de organismos en la columna de agua, además del tamaño de éstos.

En el punto de inflexión entre la fase exponencial e inicio de la estacionaria, la disminución de clorofila por célula podría estar provocada al empezar a escasear los nutrientes, primordiales para la producción de clorofila.

Al tener solo tres muestras, no se puede interpretar con seguridad la tendencia que sigue la cantidad de clorofila por célula.

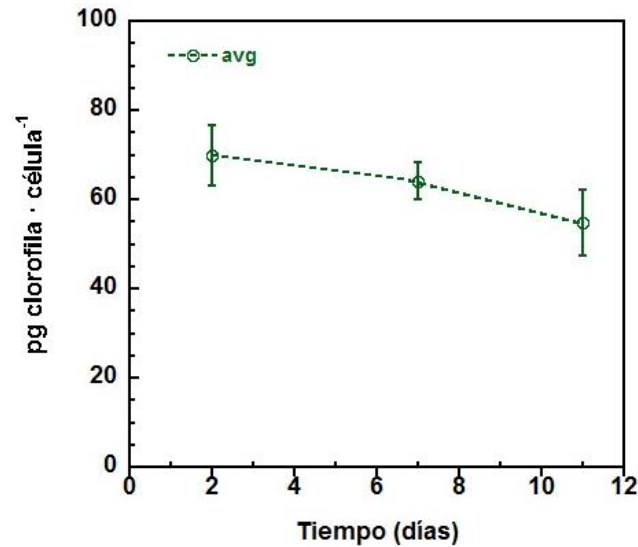


Figura 28: Media de la clorofila por célula del experimento 3.

4.3.4. Comparación del crecimiento de los experimentos 2 y 3

Al tener datos de dos experimentos diferentes, pero con los mismos parámetros analizados, es interesante contrastar la información obtenida en ambos. En este apartado se hace la comparación entre la evolución del cultivo en el experimento 2, durante 12 días, y del experimento 3, de 11 días de duración. Tanto para las muestras de células suspendidas en el medio (Free) como para las células totales.

En el gráfico de la izquierda (figura 29), con las medias de las muestras *Total*, se puede comprobar como las dos curvas de crecimiento presentan una tendencia similar.

Anteriormente, se ha obtenido la tasa de crecimiento para el experimento preliminar (experimento 2) a partir de la recta de regresión del crecimiento exponencial (tiempos 1 - 4) con la variable clorofila, resultando ser 0.479 días^{-1} .

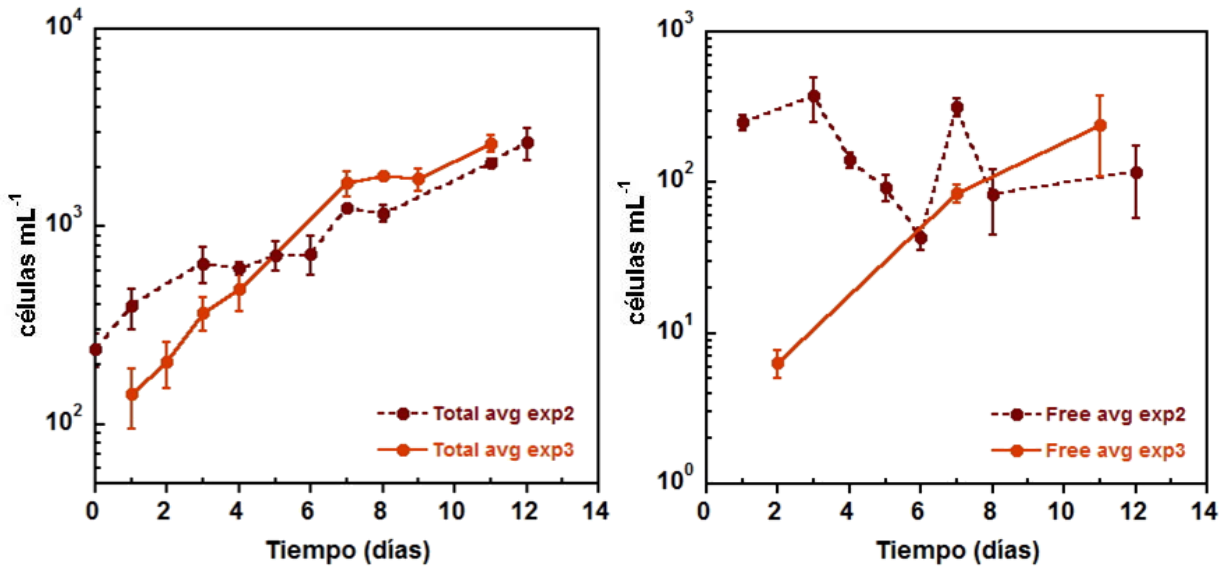


Figura 29: Comparación entre los experimentos 2 y 3. Gráfico de la izquierda evolución media del número de células de las muestras *Total*, gráfico de la derecha evolución media del número de células de las muestras suspendidas (*Free*), del experimento preliminar y avanzado.

Por otro lado, se ha obtenido la tasa de crecimiento del experimento avanzado (experimento 3) mediante la variable “número de células”, a partir de su recta de regresión durante la fase exponencial (tiempos 1 - 7), la tasa resulta ser de 0.409 días⁻¹. Además, se comprueba con la fórmula de Guillard (1973) el valor de la tasa de crecimiento. Complementariamente, se emplea la variable clorofila (tiempo exponencial: 2 - 7) para comprobar esta tasa de crecimiento, usando la fórmula de Guillard. El resultado obtenido, es muy parecido al calculado con la variable “número de células”, de 0.410 días⁻¹.

$$\mu = \frac{\ln(106.9/13.7)}{7 - 2} = 0.410 \text{ d}^{-1}$$

En conclusión, para el experimento 3 se confirma su tasa de crecimiento, al hallarla de tres maneras distintas. Aunque ésta sea ligeramente inferior a la obtenida en el experimento 2, en los gráficos se puede ver como el cultivo del experimento 3 presenta una pendiente exponencial mayor.

Este hecho demuestra que el cultivo del tercer experimento estaba mejor adaptado en los frascos en comparación con el del experimento 2, aunque inicialmente partía con una menor concentración de células. La tasa de crecimiento del experimento 2 habría que compararla con otros parámetros que

fueran más representativos, ya que su curva de crecimiento es atípica. Por lo tanto, el cultivo del experimento 2 no se adaptó a las condiciones experimentales.

En la figura 24 se han representado las fases típicas del crecimiento de un cultivo discontinuo (o *batch*). En general, los cultivos parten de una etapa de latencia o *lag*, de diferente duración. Si se han inoculado a partir de un cultivo en fase exponencial, la fase *lag* es mínima. El nuestro empieza directamente con el crecimiento exponencial (I), ya que se hizo la transferencia durante esta fase, hasta llegar a un punto de inflexión donde se inicia la fase estacionaria o *stationary* (II), y finalmente, en vez de darse la senescencia o *decay* (vendría a ser la curva típica por defecto de los cultivos), se observa una cierta remontada (III). Es difícil explicar sus motivos, por lo que se puede concluir que el cultivo había llegado a una fase estacionaria transitoria, experimentó algún cambio fisiológico, y volvió a crecer exponencialmente.

En el gráfico de la derecha de la figura 29, se representan las medias de las muestras *Free*. Cada curva de crecimiento tiene una tendencia diferente, debido a que este parámetro tiene una fuerte variabilidad condicionada a la manipulación y a la posibilidad de coger o no agregados. Los errores entre las 3 réplicas son moderados, pero el valor entre los diferentes tiempos es variante, en especial para el experimento 2.

Si se compara la relación de células *Free* entre las *Total* de los dos experimentos, se ve como tienen una concordancia inversa. Comparando tiempos similares en los dos casos, como los tiempos 3, 7 y 12 del experimento 2, que tienen un porcentaje de *Free/Total* de un 58%, 25% y 4% respectivamente. Y los tiempos 2, 7 y 11 del experimento 3, que presentan un porcentaje de 3%, 5% y 9%, respectivamente. Se ve una clara tendencia a la merma de la fracción *Free* en el estudio preliminar, y una tendencia de aumento leve en el caso del experimento avanzado.

4.3.5. Comparación con los resultados *in situ*

La proliferación que cada año aparece en el *hot spot* de Sant Andreu de Llavaneres durante al menos dos meses, llega a una concentración máxima de $10^4 - 10^5$ células/gramo de peso fresco de macroalga (Vila *et al.*, 2010).

La población de células de *O. cf. ovata* crece exponencialmente, doblando su población en dos días (exactamente en 1.96 días) durante el *bloom* del 2013. En el artículo de Vila *et al.* (2016) estimaron una tasa de duplicación de 0.51 divisiones por día, de modo que se calcula la tasa de crecimiento, resultando ser de 0.3535 días^{-1} . Este crecimiento exponencial se da durante casi un mes, desde julio hasta agosto.

El cultivo utilizado para nuestros experimentos provenía de células aisladas de una muestra natural de este *hot spot*, por lo que se puede contrastar acertadamente el crecimiento de esta especie de microalga en el medio natural, con el crecimiento en condiciones experimentales. Es común tener una tasa de crecimiento mayor en el laboratorio ya que no están sometidos a tantas amenazas y adversidades como las que presenta el medio marino. De hecho, el valor estimado en Llavaneres sería una tasa de crecimiento neta, entendiendo que puede existir depredación, dispersión de células por las corrientes, pero también una reproducción *in situ*.

4.3.6. Volumen celular

Otros parámetros de gran interés son las dimensiones celulares de *O. cf. ovata*. Mediante un estudio fotográfico, se han obtenido los siguientes parámetros: diámetro dorsoventral (DV), transdiámetro (W) y el área exacta.

Los datos del diámetro anteroposterior (AP) se calculan a partir de la relación obtenida en el artículo de Accoroni *et al.* (2012a), dónde hacen un análisis morfológico de las células de *O. cf. ovata* con relación a las condiciones ambientales y a las fases de la proliferación. En dicho estudio, los análisis morfométricos se desarrollaron con unas muestras de campo del noroeste del

mar Adriático. La relación DV/AP que obtuvieron está comprendida dentro del rango de 1.50 a 3.43, con un valor medio de 2.31 ± 0.37 (valor usado para realizar el cálculo de nuestros diámetros anteroposteriores).

Los datos de volumen se calcularon mediante la aproximación de la forma de las células de *O. cf. ovata* a la forma geométrica de un elipsoide (Hillebrand *et al.*, 1999).

Todos los datos obtenidos se presentan en tablas, el valor que se da es la media de los tres frascos (#A, #B y #C), además de su error estándar (*standard error of the mean, SEM*).

Al tratarse de tres tiempos suficientemente separados y representativos de cada fase del crecimiento, se juntan los valores de las tres réplicas (#A, #B y #C) para cada tiempo, por lo tanto, en cada tiempo se da el valor medio de los tres frascos juntados.

Además, se halla el coeficiente de variación de las distintas variables durante los tres tiempos, para concluir que los valores de cada variable se mantienen prácticamente constantes. Las variables de volumen y área presentan un mayor coeficiente de variación que las longitudes unidimensionales.

Los datos obtenidos para **todas** las células del experimento 3 sin distinguir su categoría, han resultado de analizar un total de 150 células en el tiempo 2, 177 células en el tiempo 7 y 174 células en el tiempo 11, como se puede ver en la tabla X.

Tiempo	Fecha	DV (μm)	W (μm)	Área (μm^2)	AP (μm)	Volumen (μm^3)
2	13/07/16 N= 150	50.97 \pm 0.5	42.49 \pm 0.46	1718.94 \pm 32.27	22.07 \pm 0.22	25936.15 \pm 701.65
7	18/07/16 N= 177	54.60 \pm 0.66	43.34 \pm 0.57	1901.40 \pm 40.41	23.64 \pm 0.29	31240.38 \pm 895.80
11	22/07/16 N= 174	56.68 \pm 0.60	44.71 \pm 0.54	2021.24 \pm 39.57	24.54 \pm 0.26	34158.92 \pm 925.26

Tabla X: Características morfométricas de *O. cf. ovata* del experimento 3. DV, diámetro dorsoventral; W, transdiámetro; AP, anteroposterior; N, número de muestras. Formato de los valores: $\bar{x} \pm \varepsilon$.

La morfometría de las células de *O. cf. ovata* del cultivo utilizado para el experimento 3, durante el tiempo 2, oscila desde 31 – 66 μm para el diámetro DV, desde 22 – 55 μm para el W, desde 537 – 2642 μm^2 para el área, desde 13 – 29 μm para el AP y desde 4759 – 50395 μm^3 para el volumen.

Durante el tiempo 7, el rango es de 11 – 70 μm para el diámetro DV, de 11 – 60 μm para el W, desde 91 – 3078 μm^2 para el área, entre 5 – 30 μm para el AP y desde 288 – 60000 μm^3 para el volumen.

Y para el tiempo 11, los parámetros están dentro del intervalo 22 – 79 μm para el diámetro DV, de 18 – 62 μm para el W, desde 328 – 3622 μm^2 para el área, entre 10 – 34 μm para el AP y desde 2148 – 82235 μm^3 para el volumen.

A continuación, se hace distinción entre el tamaño de células vegetativas y quistes. Para identificar el organismo, se mira si la teca reacciona o no con el calcofluor. Cuando la teca emite un color azul intenso, significa que la célula es vegetativa.

Los datos obtenidos en el análisis fotográfico, solo para las **células vegetativas** (*vc*) se encuentran recogidos en la tabla XI y representadas en las figuras 30, 31, 32 y 33.

Tiempo	Fecha	vc DV (μm)	vc W (μm)	vc Área (μm^2)	vc AP (μm)	vc Volumen (μm^3)
2	13/07/16 N= 147	50.98 \pm 0.50	42.48 \pm 0.46	1718.60 \pm 32.26	22.07 \pm 0.22	25925.55 \pm 700.93
7	18/07/16 N=158	56.13 \pm 0.50	44.40 \pm 0.50	1978.95 \pm 36.93	24.30 \pm 0.22	32846.14 \pm 867.27
11	22/07/16 N= 162	57.63 \pm 0.48	45.32 \pm 0.48	2068.02 \pm 35.35	24.95 \pm 0.21	35100.02 \pm 840.26

Tabla XI: Características morfométricas de las células vegetativas de *O. cf. ovata* del experimento 3. DV, diámetro dorsoventral; W, transdiámetro; AP, anteroposterior; vc, *vegetative cells*; N, número de muestras. Formato de los valores: $\bar{x} \pm \epsilon$.

Los diagramas de cajas o *box plot* son considerados la mejor opción de representar los datos biométricos obtenidos, ya que no se pierde información. Se trata de un gráfico estadístico basado en cuartiles, cada caja comprende el 50 % de los datos con el valor de la mediana presentado con una línea horizontal. La parte de arriba y de abajo de cada caja marcan el límite de ± 25 % de la variable. Las barras que se prolongan tanto arriba como debajo de cada caja, marcan el valor máximo y mínimo de la serie de datos que encajan dentro de un rango aceptable. Los valores fuera de rango, llamados *outliers*, se muestran como un punto individual (contorno azul y sin relleno). La media del número de observaciones de los distintos parámetros se representa con un punto negro.

Para empezar a analizar los datos, primero se realiza el test de la normalidad, para comprobar si los valores siguen o no esta distribución específica. Los resultados obtenidos en el test, de las variables analizadas y representadas en los diagramas de cajas, se encuentran recogidos en la tabla XII. Solo se hace la estadística para los valores de las células vegetativas, ya que interesa verificar el crecimiento de las células más abundantes en el cultivo, por lo tanto, las que representarán mejor la evolución del cultivo.

Descripción estadística del test de la normalidad:

Hipótesis nula H_0 : Datos siguen una distribución normal
 Hipótesis alternativa H_1 : Datos no siguen una distribución normal

Tiempo	DV	W	Área	Volumen
t_2	0.4378	0.0744	0.3108	0.3392
t_7	0.3112	0.0128	0.0386	<0.0050
t_{11}	0.0052	0.0634	0.0286	0.0226

Tabla XII: Resultados del test de la normalidad. Valores p para cada variable en cada tiempo muestreado y considerando los 3 frascos.

El valor p es la probabilidad que mide la evidencia contra la hipótesis nula. Las probabilidades que sean más bajas, por lo tanto, un valor p pequeño, proporcionan una evidencia más fuerte contra la hipótesis nula. Al comparar los resultados de la tabla con el nivel de significación, $\alpha = 0.05$, se observa que para el tiempo 7 el W no sigue una distribución normal y en el tiempo 11 el DV tampoco, consecuentemente sus áreas y volúmenes tampoco siguen una distribución normal, por lo que se debe de rechazar la hipótesis nula. Los únicos parámetros que siguen una distribución normal son los DV, W, área y volumen del tiempo 2.

Por lo tanto, para poder comparar los datos de cada parámetro entre las tres fases distinguidas, se realiza el test de Mann-Whitney. Como no se puede presuponer que los datos siguen una distribución específica, se escoge este test no paramétrico.

Descripción estadística test de Mann-Whitney:

Hipótesis nula $H_0: \eta_1 - \eta_2 = 0$
 Hipótesis alternativa $H_1: \eta_1 - \eta_2 \neq 0$

Siendo η_1 , el valor de la mediana del grupo 1 y η_2 , el valor de la mediana del grupo 2.

Gracias a los datos paramétricos obtenidos y a su representación, se puede ver la clara relación entre las dimensiones de las células y las diferentes fases del cultivo. A continuación, se exponen los gráficos y los resultados estadísticos de la comparativa entre los valores en los períodos de tiempo.

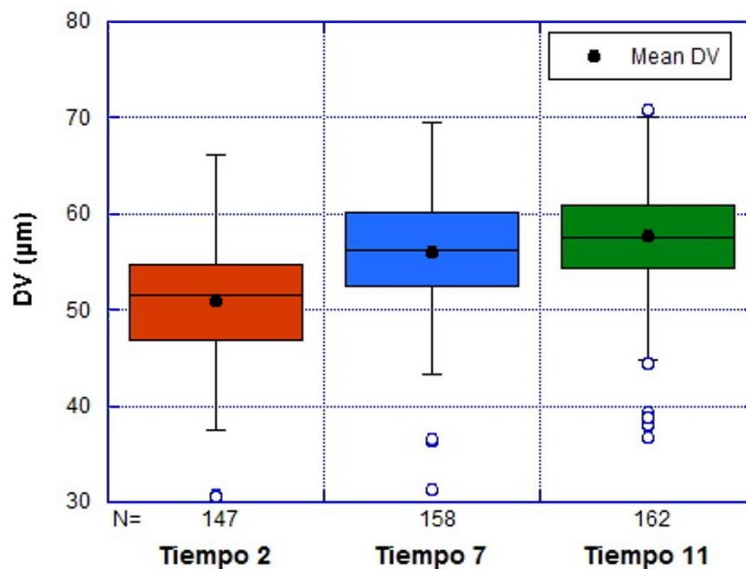


Figura 30: Diagrama de cajas de los diámetros dorsoventrales de células vegetativas del experimento 3.

En la figura 30 se observa la evolución del DV. El resultado del test de Mann-Whitney de la comparación entre los valores del tiempo 2 y el tiempo 7, al igual que del tiempo 2 y el tiempo 11, es que son estadísticamente significativos ($p < 0.0001$), por lo tanto, en ambos casos se rechaza la hipótesis nula. Es decir, el DV del t_2 es diferente del t_7 y del t_{11} . También, al comparar las medianas de los tiempos 7 y 11, se obtiene un valor p de 0.0148, por esta razón también se rechaza la hipótesis nula.

En conclusión, se confirma con el test estadístico que existen evidencias significativas entre los valores del DV en los 3 tiempos, por lo que la longitud va aumentando a medida que transcurre el tiempo.

La evolución del transdiámetro parece mantenerse más constante, así que el crecimiento celular referente a la anchura es más lento, tal y como se muestra en la figura 31.

Al realizar la comparativa, se obtiene que el W del tiempo 2 y 7 son significativamente diferentes ($p=0.0117$), por lo tanto, no se cumple la hipótesis nula. De igual modo, las dos distribuciones de W del tiempo 2 y 11 son diferentes, los tamaños son significantes ($p<0.0001$). En cambio, al contrastar la anchura de las células de los tiempos 7 y 11, se obtiene que los tamaños no son significativos ($p=0.1009$), por lo tanto, no es estadísticamente significativo y no se puede rechazar la H_0 .

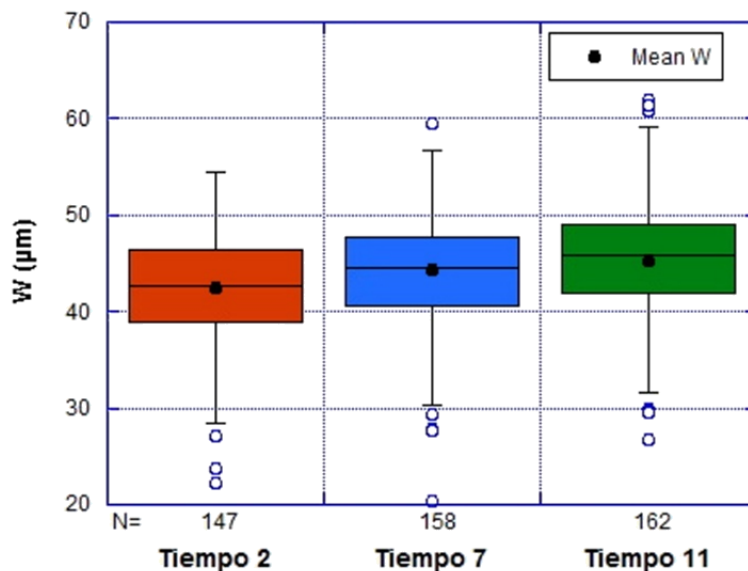


Figura 31: Diagrama de cajas de los transdiámetros de células vegetativas del experimento 3.

La superficie exacta de las células se consigue gracias al análisis fotográfico y las herramientas disponibles en el programa ImageJ. Los datos obtenidos se representan en la figura 32.

Por lo que hace a la equiparación entre las medianas en los tres tiempos, los datos son significativamente diferentes por lo que se rechaza la hipótesis nula en las tres comparativas. El valor de p obtenido al contrastar los datos del tiempo 2

y 7, y los tiempos 2 y 11 es <0.0001 en ambos casos. Del mismo modo, las áreas del tiempo 7 y 11 también resultan significativamente diferentes ($p=0.0359$).

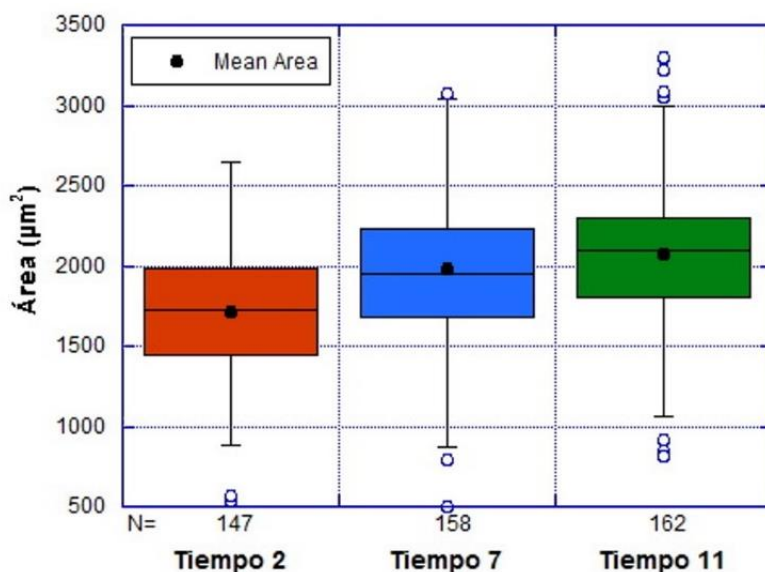


Figura 32: Diagrama de cajas de las áreas de células vegetativas del experimento 3.

Por último, se representa el volumen de las células vegetativas (figura 33), es decir de las células con reproducción asexual. El biovolumen celular correspondería a la biomasa del cultivo. La estimación de la biomasa es esencial para comparar la contribución relativa de diferentes microalgas en muestras mixtas, o entre diferentes muestras, para estudiar los procesos del ciclo celular o para convertir el biovolumen de fitoplancton a carbono (Hillebrand, 1999).

El biovolumen para el experimento 3, parte desde un valor medio de $2.6 \cdot 10^4 \mu\text{m}^3$ y finaliza con $3.5 \cdot 10^4 \mu\text{m}^3$, con lo cual se percibe el crecimiento del tamaño celular.

Los resultados del test que nos permite comparar estadísticamente los datos determinan que los volúmenes en los 3 tiempos son significativamente diferentes entre ellos. Por lo tanto, no se cumple la hipótesis nula, por lo que las medias son significativamente distintas. En concreto, el valor p entre los t_2 y t_7 , y entre los tiempos t_2 y t_{11} es de <0.0001 , entre los tiempos 7 y 11, el valor $p=0.0254$.

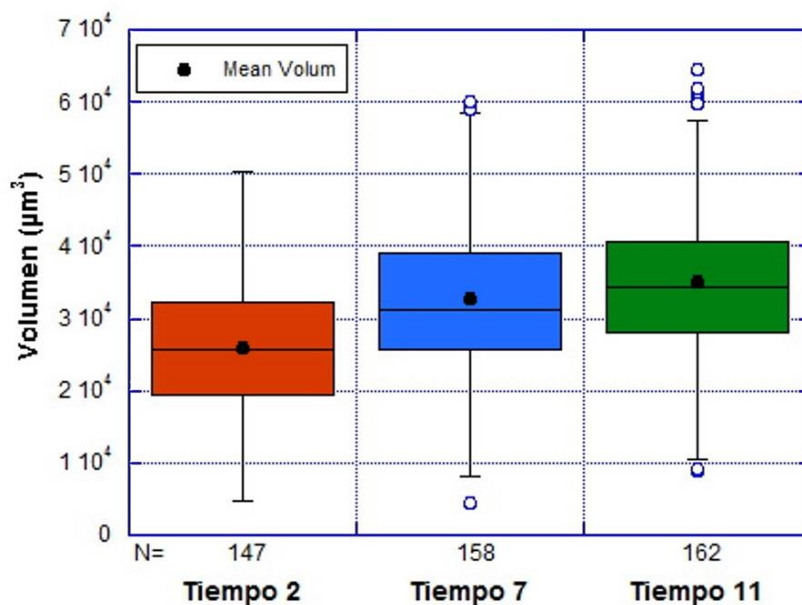


Figura 33: Diagrama de cajas de los volúmenes de células vegetativas del experimento 3.

En conclusión, los parámetros DV, área y volumen tienen una mayor diferenciación a lo largo del tiempo, apoyando la tendencia de que las células aumentan su valor longitudinal, superficial y de volumen de un modo más marcado (figuras 30, 32 y 33, respectivamente).

Cuando se ha hecho la comparativa de los valores entre la fase exponencial inicial, el punto de inflexión y el final de la fase estacionaria, se ha comprobado como los datos entre el punto de inflexión de la fase estacionaria y su final, son menos significativos, en relación con los datos en el inicio de la exponencial.

Por otro lado, las células que no reaccionan con el calcofluor, son consideradas quistes. No reaccionan con el fluorocromo porque han perdido la teca, y presentan otro tipo de pared celular con ausencia de celulosa.

Los **quistes** (*c*) encontrados, presentan tamaños muy diversos, por lo que se dividen según si son quistes grandes ($DV > 40 \mu\text{m}$) o quistes pequeños ($DV < 40 \mu\text{m}$). Las longitudes obtenidas en el análisis fotográfico para los quistes se encuentran en la tabla XIII.

Tiempo	Fecha	c DV (μm)	c W (μm)	c Área (μm^2)	c AP (μm)	c Volumen (μm^3)
2	13/07/16	QUISTES GRANDES t7 N= 3				
		50.60 \pm 4.90	42.73 \pm 5.38	1735.39 \pm 394.35	21.91 \pm 2.71	39683.10 \pm 13106.53
7	18/07/16	QUISTES PEQUEÑOS t7 N= 6				
		21.69 \pm 3.03	20.41 \pm 2.68	378.53 \pm 92.64	9.39 \pm 1.31	4157.97 \pm 1429.37
		QUISTES GRANDES t7 N= 17				
		51.18 \pm 1.17	41.15 \pm 1.37	1661.77 \pm 86.68	22.16 \pm 0.51	37295.31 \pm 2724.10
11	22/07/16	QUISTES PEQUEÑOS t11 N= 3				
		27.50 \pm 4.06	23.31 \pm 3.08	530.98 \pm 154.79	11.91 \pm 1.76	4757.06 \pm 2173.83
		QUISTES GRANDES t11 N= 9				
		52.11 \pm 4.27	43.00 \pm 3.03	1819.06 \pm 289.69	22.56 \pm 1.85	29802.76 \pm 7957.74

Tabla XIII: Características morfométricas de los quistes del experimento 3. Los quistes están divididos en quistes grandes ($>40 \mu\text{m}$) y quistes pequeños ($<40 \mu\text{m}$). DV, diámetro dorsoventral; W, transdiámetro; AP, anteroposterior; c, *cysts*; N, número de muestras. Formato de los valores: $\bar{x} \pm \varepsilon$.

La tabla XIV expresa la presencia de quistes en el cultivo (número de quistes por número de células totales), teniendo en cuenta que se trata de la presencia media de las tres réplicas. Durante el t_2 solo se vieron quistes grandes, en el frasco #A no se presenciaron quistes y en el #B y #C había un 2% y 4%, respectivamente, resultando una presencia total del 2%. En el t_7 se encontró una presencia de 9.7 % de quistes (#A), 7.7 % (#B) y 5.2% (#C), resultando una media de 7.52 % en el tiempo 7. Y por último, en el t_{11} se presenciaron un 9.84% de quistes en el frasco #A, 5% en el #B y 5.7% en el #C, con una presencia media de 6.38%.

En la fase inicial fueron encontrados pocos quistes, los que se vieron eran de tamaño considerable. Al llegar al final de la fase exponencial y principio de la fase estacionaria es cuando se encontró el porcentaje de quistes mayor y con alta diversidad morfológica. Se observaron quistes muy pequeños, el de menor tamaño tenía una longitud DV de $11 \mu\text{m}$ (figura 38A), en cambio el más grande encontrado en este punto de inflexión tenía $57 \mu\text{m}$. Luego en la fase final (t_{11}), disminuye ligeramente la presencia de quistes, y sus dimensiones también son

inferiores, aunque a excepción se encuentra uno de tamaño considerable (figura 38B).

También señalar la presencia de tecas y restos de pared celular de celulosa, que iban abundando a medida que pasaban los días.

Tiempo	Presencia quistes total	Presencia de quistes pequeños	Presencia de quistes grandes
2	2%	0%	100%
7	7.52%	32%	68%
11	6.38%	25%	75%

Tabla XIV: Presencia de quistes en el cultivo del experimento 3. El % de quistes pequeños y grandes es sobre el total de quistes.

El tamaño de los quistes tanto de un cultivo como en el campo es una pregunta abierta, hay que investigar con más austeridad para conocer sus características, presencia e implicaciones en el ciclo de vida de *Ostreopsis*.

4.3.7. Comparación tamaño celular con resultados *in situ*

Existen estudios que muestran la variabilidad morfométrica de una población natural. En concreto, Accoroni *et al.* (2012a) evalúan si existe una relación entre las dimensiones celulares, las condiciones ambientales y las fases de la proliferación de muestras naturales del norte del mar Adriático, en la costa italiana. Asimismo, investigan la variabilidad morfológica de dos áreas, una que queda más expuesta y la otra más resguardada.

El *bloom* estudiado se desarrolló en 2009 y 2010, presenta las tres fases (inicial, de proliferación y de disminución).

Cuando se comparan las dimensiones (DV) de las muestras en dos áreas con diferentes condiciones hidrodinámicas, obtienen que las células son significativamente más pequeñas en el punto más resguardado. También, observan que las células presentes en la columna de agua tienen dimensiones mayores en comparación con las bentónicas en la macroalga.

En este estudio se recopilan datos de diámetro dorsoventral en función a la fase de crecimiento, el sitio y el sustrato donde se encontraba adherida la microalga. Los valores medios de DV de la proliferación del 2009, quedan recogidos en la tabla XV.

Fases de crecimiento (A)		
Inicial - DV (μm)	Proliferación - DV (μm)	Declive - DV (μm)
49.10 \pm 6.52	50.48 \pm 8.58	55.58 \pm 7.91
Sitios (B)		
Resguardado - DV (μm)	Expuesto 1 - DV (μm)	Expuesto 2 - DV (μm)
49.58 \pm 8.17	51.88 \pm 7.53	52.42 \pm 9.29
Tipo de sustrato (C)		
Macroalga - DV (μm)	Rocas - DV (μm)	Columna de agua - DV (μm)
50.81 \pm 8.32	51.46 \pm 8.48	53.10 \pm 7.87

Tabla XV: Resultados del diámetro dorsoventral medio en muestras naturales de *O. cf. ovata* en 2009. (A) En función a las fases de crecimiento: inicial, exponencial y estacionario en los 3 puntos de muestreo. (B) En función a los 3 puntos de muestreo, uno resguardado y dos expuestos. (C) En función al tipo de sustrato que se encontraban adheridas. Formato: $\bar{x} \pm \text{STD}$ (*Standard deviation*). Fuente: Accoroni *et al.* (2012a).

Al comparar las tablas X y XV, nuestros valores y los obtenidos en el estudio de Accoroni, respectivamente, se pueden sacar las siguientes ideas. Nuestro cultivo del experimento 3, presenta un crecimiento celular parecido a los valores obtenidos en el estudio del Adriático, aunque las poblaciones en estado natural, sufren mayores impactos externos que las cultivadas. Por otro lado, las cultivadas pueden padecer aberraciones morfológicas debido a la incapacidad de adaptarse a las condiciones experimentales, aun así, acostumbran a tener tamaños superiores a las células en su hábitat natural.

Por lo que hace al sitio, es difícil de determinar, pero se observa como las células al estar más expuestas presentan un mayor tamaño. Por último, según el tipo de sustrato al que podríamos encontrar nuestro cultivo, inicialmente durante la proliferación, estaría adherido a la macroalga, al manifestar las mismas

medidas. Al llegar a la fase de inflexión y estacionamiento, pasaría a formar parte de la columna de agua, ya que ambas poblaciones, muestran dimensiones mayores a las que se encuentran en la macroalga y las rocas.

4.3.8. Categorización celular

Una vez caracterizado el cultivo con los parámetros bioquímicos, tomadas las medidas de longitud, superficie y volumen, se categorizan las diferentes células encontradas ya sean quistes o células vegetativas, según su morfología externa, color y separación de la membrana externa.

Todas las fotografías que han sido usadas para recopilar los datos de tamaño celular se han tomado a 20X, aunque algunas fotografías se han hecho usando el aumento 40X, para observar con mayor detalle las células.

A continuación, se muestran algunas de las fotografías seleccionadas para cada tiempo, todas pertenecen al cultivo del experimento 3. Cada agrupación de fotografías tiene una fotografía de cada frasco, para ver la diferenciación entre réplicas, además de un quiste.

Las imágenes de la figura 34, pertenecen al tiempo 2, cuando se inicia la proliferación, se observa que las células de los diferentes frascos, presentan una morfología muy similar. Por lo tanto, las tres réplicas contienen células con formas semejantes, se podría decir que con características iguales. Las células vegetativas tienen una tonalidad más clara, con la pared celular bien diferenciada del resto del cuerpo. Los quistes, en cambio, son visiblemente más oscuros, con una forma más definida y redondeados.

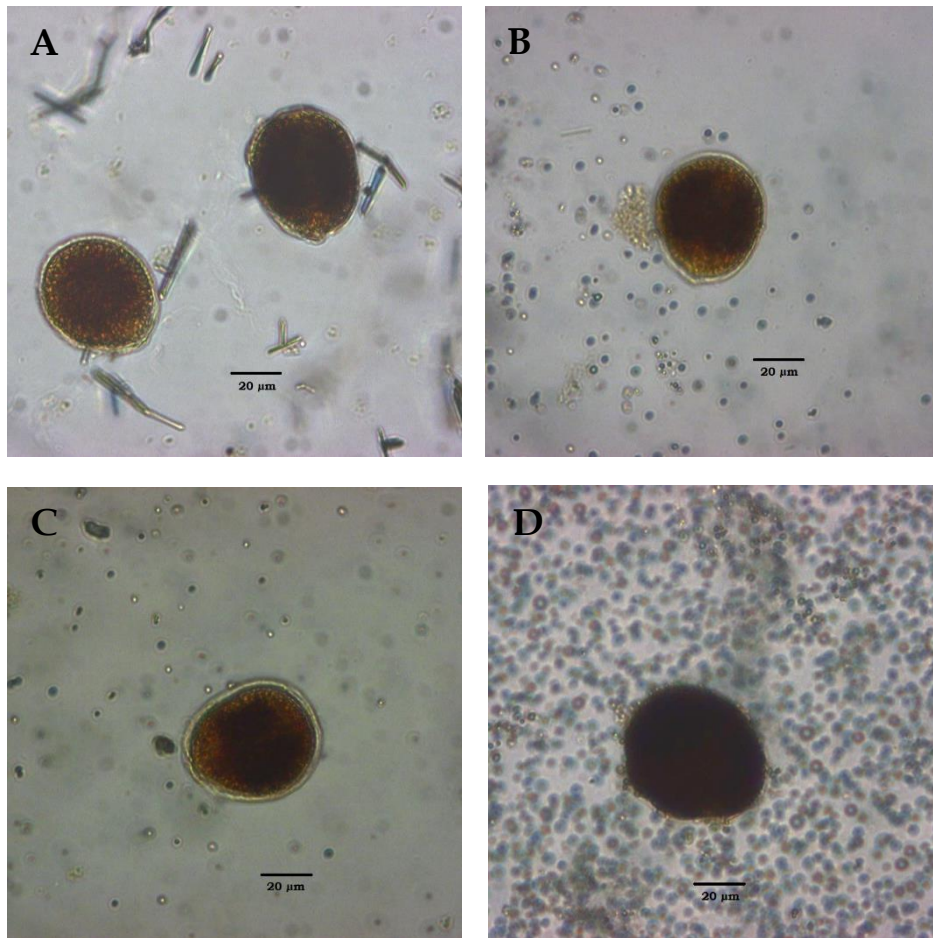


Figura 34: Imágenes de *O. cf. ovata* en el t_2 , durante el inicio de la fase exponencial. (A) Células vegetativas pertenecientes al frasco #A. (B) Célula vegetativa perteneciente al frasco #B. (C) Célula vegetativa perteneciente al frasco #C. (D) Quiste del frasco #C. Escalas de las barras= 20 μm .

A medida que transcurre el tiempo, la diversidad morfológica entre los tres frascos se hace más notable. En la figura 35 (A, B, C) se puede comprobar este hecho, se encuentran diferentes tamaños variantes, aunque las células vegetativas siguen teniendo un cuerpo color marrón-amarillento claro. Con la luz blanca, en algunas células se puede observar unos grumos más oscuros, anaranjados, en el interior del citoplasma.

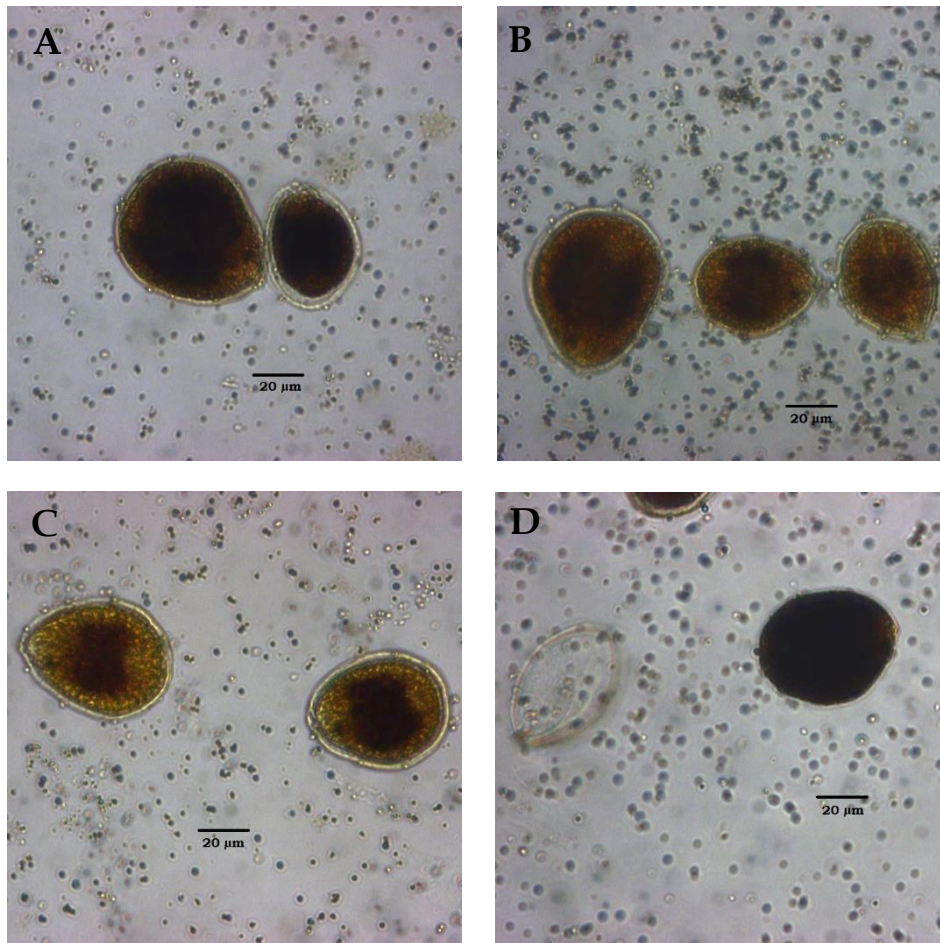


Figura 35: Imágenes de *O. cf. ovata* en el t_7 , punto de inflexión donde se inicia la fase estacionaria. (A) Células vegetativas pertenecientes al frasco #A. (B) Células vegetativas perteneciente al frasco #B. (C) Células vegetativas perteneciente al frasco #C. (D) Quiste del frasco #A, además se observa una teca en la izquierda. Escalas de las barras= 20 µm.

Al final del seguimiento, cuando el cultivo termina la fase estacionaria e incluso se da una segunda remontada, se observan aberraciones y se encuentran cada vez más células amorfas. La diversidad morfológica se hace notable durante el final de la fase estacionaria, tal y como se aprecia en la figura 36. Las células de las tres réplicas presentan menos características similares, en comparación al inicio del experimento. Del mismo modo, los quistes siguen conservando su aspecto completamente redondeado y de color más oscuro.

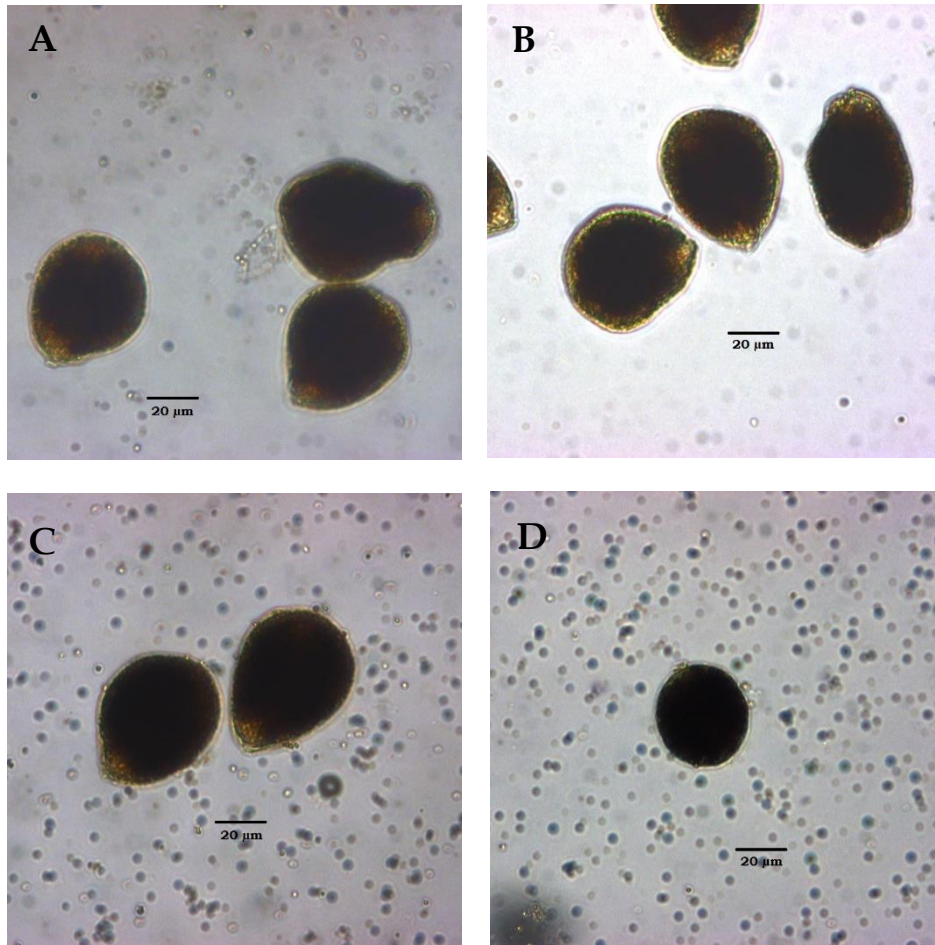


Figura 36: Imágenes de *O. cf. ovata* en el t_{11} , durante el final de la fase estacionaria. (A) Células vegetativas pertenecientes al frasco #A. (B) Células vegetativas perteneciente al frasco #B. (C) Células vegetativa pertenecientes al frasco #C. (D) Quiste del frasco #B. Escalas de las barras= 20 μm .

Además, se realizan fotografías con la luz ultravioleta para poder observar la estructura de la teca y la orientación de la célula. Las imágenes tomadas a 40X se encuentran indicadas.

Había muchas células que estaban perdiendo su pared celular, en especial en el tiempo 7. En el tiempo 11, se observan más tecas libres y células con trozos de teca ya desprendidos. *O. cf. ovata* puede perder la teca de diversas formas. En la figura 37 (B), la pared celular empieza a romperse por el cingulo, de modo que la hipoteca y epiteca se abren. En cambio, en la imagen (D) de la figura 37, la teca se rompe en varios trozos que se van desprendiendo.

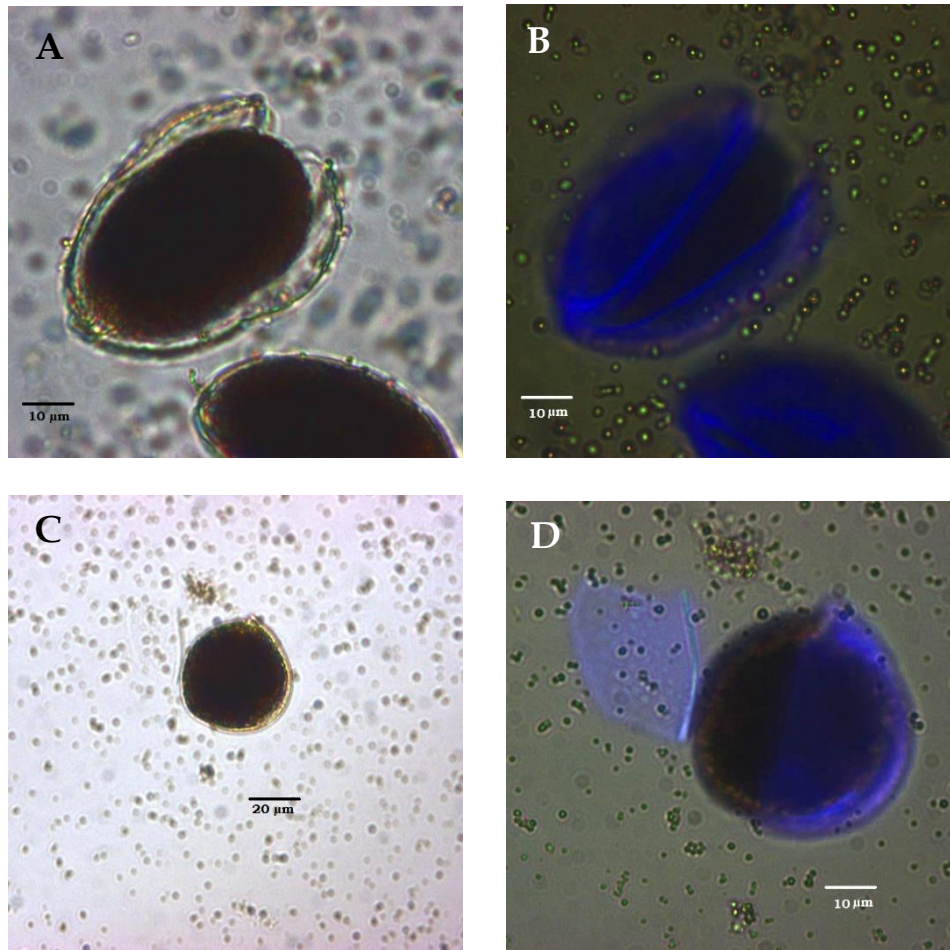


Figura 37: Imágenes de células vegetativas perdiendo la teca. (A) Célula vegetativa en el tiempo 7, del frasco #A. Aumento 40X. (B) Misma célula que (A) con luz ultravioleta. (C) Célula vegetativa en el tiempo 11, del frasco #A. Aumento 20X. (D) Misma célula que (C) con luz ultravioleta. Aumento 40x. Escala de las barras= 10 μm (A, B, D) y 20 μm (C).

Tal y como se ha expuesto anteriormente, en la tabla XIII, existe una gran variedad de quistes. Los quistes más pequeños, considerados por debajo de 40 μm (DV), pueden llegar a tener tamaños muy reducidos, con un diámetro dorsoventral de 11 μm , y un volumen de 300 μm^3 (el más pequeño encontrado, en la figura 38 el A). El quiste más grande de los analizados mide 78.68 μm (DV) y tiene un volumen de 82234.79 μm^3 (figura 38, B).

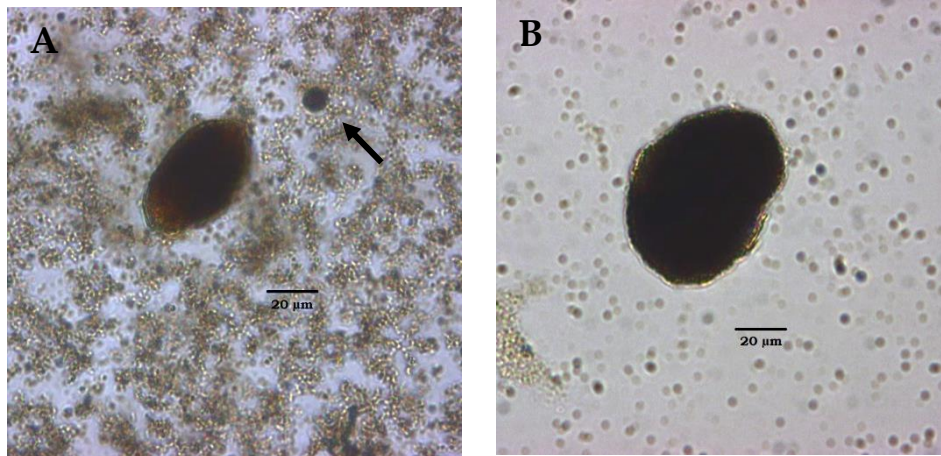


Figura 38: Imágenes de quistes de diferentes tamaños. (A) Célula vegetativa (izquierda) y quiste pequeño (derecha, indicado con una flecha) en el tiempo 7, del frasco #B. (B) Quiste grande en tiempo 11, del frasco #A. Escala de las barras= 20 µm.

Para la identificación de los quistes, tenemos el método de la tinción con calcofluor, que junto con la luz ultravioleta se ve claramente si la pared celular es de celulosa o no, por lo tanto, si es una célula vegetativa o un quiste. También se puede distinguir según la morfología, los quistes presentan una estructura más compacta, redondeada y con el interior más oscuro, prácticamente negro. La pared celular tiene otra composición, diferente a la celulosa, y está menos diferenciada del cuerpo. Todas estas características de los quistes se observan en la figura 39.

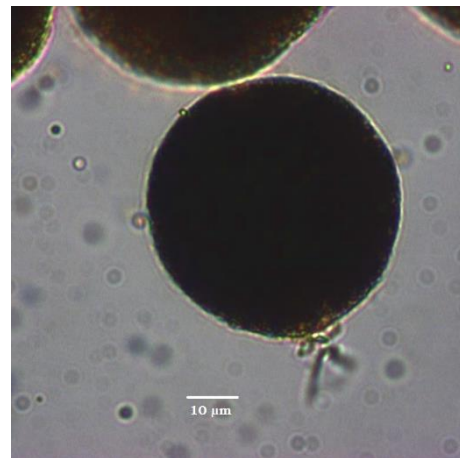


Figura 39: Imagen a 40X de un quiste. Pertenece al frasco #B, durante el tiempo 11. Escala barra= 10 µm.

Además, la luz ultravioleta es de gran utilidad ya que facilita la observación de la estructura de la pared celular y su disposición en el espacio. En las imágenes de la figura 40 se pueden ver el cingulo, la hipoteca y la epiteca, e incluso en alguna de ellas el complejo del poro apical.

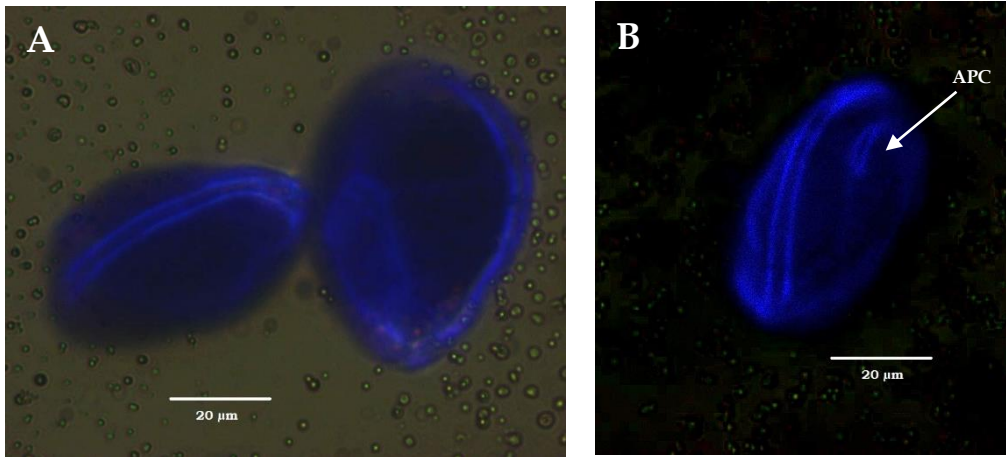


Figura 40: Imágenes de células vegetativas con epifluorescencia a 40X. (A) Células de *O. cf. ovata* en el tiempo 11, del frasco #A. En la de la izquierda se observa el cíngulo. En la de la derecha las placas de la hipoteca. (B) Célula en el tiempo 2 del frasco #B, situada de lado. Se observa el cíngulo y el complejo del poro apical (APC).

Las células pueden estar orientadas en diferentes planos, dependiendo de cómo hayan caído en la cámara de sedimentación a la hora de su observación.

4.3.9. Comparación morfológica con clasificación establecida

En el estudio de Accoroni *et al.* (2014) se hace una clasificación de los diferentes morfotipos celulares distinguidos tanto en muestras naturales como en cultivos a partir de éstas. Se recogen las muestras durante las proliferaciones del 2007 y 2008 en el norte del mar Adriático, Mediterráneo. Por otro lado, también se investigan las condiciones de temperatura para la germinación de los quistes de *Ostreopsis* en sedimentos naturales.

Resultó que el morfotipo más común en ambas muestras (naturales y cultivos) fue la típica célula con forma de gota y de coloración marrón-amarillenta, conocida como célula vegetativa.

Otros morfotipos celulares encontrados en los cultivos descritos por Accoroni *et al.* se identificaron como: células pequeñas, *dark cells*, células redondeadas con un tapón (*roundish cells with a plug*), los quistes se distinguieron según su pared celular: quistes con pared fina (*thin-walled cysts*) o quistes con doble pared (*double-walled cysts*). Estos morfotipos fueron observados en los cultivos del mar

Adriático con un porcentaje de abundancia distinto. A continuación, se explica cada uno de los morfotipos descritos en el artículo científico.

Se consideran células pequeñas, aquellas con un diámetro dorsoventral inferior a 42.5 μm . Por lo tanto, tienen un tamaño menor que las células vegetativas y presentan un citoplasma más claro, a veces con grumos anaranjados. La presencia de las células pequeñas en todos los frascos de cultivo tuvo una abundancia constante, sin exceder el 12% del total de células, por lo que representan una fracción pequeña, pero constante.

Las *dark cells* tienen una forma más redondeada que las células vegetativas, son inmóviles con el citoplasma grumoso. A diferencia de las vegetativas, su pared celular se ve menos diferenciada, y no se observa el poro apical. Aunque en algunas, se distingue una marca redonda de algún proceso no descrito todavía. La presencia de *dark cells* aumenta al llegar a la fase estacionaria.

En algunas células, llamadas *roundish cells with a plug*, tanto en cultivos como del medio natural, se observa como un tapón en la membrana externa. Estas células son inmóviles, redondas u ovaladas y con una coloración clara. Se cree que este “tapón” está relacionado con los procesos de fertilización.

En los cultivos, encontraron dos tipologías de quistes, ambos inmóviles: los *thin-walled cysts* y los *double-walled cysts*. Los primeros son los más abundantes, tienen una pared externa que protege la membrana celular, llamada *pellicle*, muy delgada y de tan solo una capa. Se consideran quistes de corto plazo, ya que en condiciones favorables y en un período corto de tiempo (3h. - 2d.) germinan a células vegetativas. En las muestras naturales también se observaron quistes de doble pared, tienen una pared más gruesa y diferenciadas que los anteriores. Estos quistes considerados de reposo tienen un período de germinación superior, después de 5 meses de inactividad pueden germinar con una temperatura de 25 °C.

En nuestros cultivos encontramos mayoritariamente células vegetativas, con una alta abundancia. La presencia de células pequeñas es de 7.5%, 1.9% y 2.5% en los tiempos t_2 , t_7 y t_{11} , respectivamente. No se vieron células del tipo redondeadas y con el tapón en la pared externa, ya que al tratarse de muestras fijadas con lugol, se hacía difícil apreciar los detalles de la superficie de la célula.

La mayoría de quistes encontrados en nuestros cultivos se tratan de quistes con pared fina y con una sola membrana externa. Además, destacar la alta variabilidad de las dimensiones de los quistes presentes en el cultivo.

5. CONCLUSIONES

Para realizar experimentos con dinoflagelados que producen mucílago, hay que tener en cuenta que el tipo de muestreo permita obtener una muestra representativa del cultivo, evitando los agregados, pero también garantizando que la afectación de las células sea mínima. Así, una excesiva agitación, necesaria para romper los agregados, podría romper las células. Por lo tanto, es importante que el tipo de muestreo y el tratamiento de los mismos se adecue a las características de la especie a estudiar.

Los parámetros utilizados en este estudio, número de células y concentración de clorofila, permiten seguir la evolución de los cultivos en las condiciones experimentadas, caracterizando algunos aspectos fisiológicos como la biomasa, la tasa de crecimiento y el tiempo de duplicación.

La fracción *Free* nos da información sobre la cantidad de células asociadas al mucílago, en relación con la población total de células. Si el porcentaje es bajo, esto implica que la mayoría de las células se encuentran en los agregados. En cambio, si es alto, la cantidad de agregados es baja, por lo que las células están libres y probablemente el inóculo contenía poco mucílago. En la representación de los datos *Free* se observa la inestabilidad de la tendencia, ya que tiene una fuerte variabilidad condicionada a la manipulación y a la posibilidad de coger o no agregados.

Los experimentos de preparación de las técnicas de muestreo y el preliminar (experimento 1 y 2, respectivamente) sirven como ensayos previos al experimento ya más elaborado (experimento 3).

En el experimento 2, la curva de crecimiento es poco típica, por tanto, se considera que el cultivo no se encontraba suficientemente adaptado a las condiciones experimentales. Para calcular la tasa de crecimiento se utilizan los datos de la concentración de clorofila, resultando ser de 0.479 días^{-1} .

En el experimento 3, la curva de crecimiento se aproxima más a la de una trayectoria típica, ya que se ven mejor representadas las fases de un cultivo. Las distintas fases desarrolladas son: el tiempo 2, inicio de la fase exponencial; tiempo 7, punto de inflexión entre el fin del crecimiento exponencial e inicio de la fase estacionaria; y el tiempo 11, fase estacionaria transitoria, ya que el cultivo experimenta algún cambio fisiológico y vuelve a crecer exponencialmente. La tasa de crecimiento de este cultivo es de 0.409 días^{-1} , obtenida a partir del número de células, asimismo, esta tasa de crecimiento coincide si se calcula con la concentración de clorofila.

Como el cultivo procede de aislar células de una muestra natural recogida en la playa de Sant Andreu de Llanerres (situado en la comarca del Maresme, Cataluña), se compara la tasa de crecimiento obtenida en los experimentos con la de la población natural que prolifera, se podría decir, anualmente. El *bloom* generado en el 2013, tuvo una tasa de crecimiento de 0.354 días^{-1} . Es normal que en su hábitat natural tengan una tasa de crecimiento menor que en el laboratorio, ya que la población está sometida a mayores amenazas e infortunios. Por lo tanto, el valor estimado en Llanerres es una tasa de crecimiento neta, ya que se tiene en cuenta que existe la depredación, dispersión de células por las corrientes, pero también se considera la reproducción.

Al comparar los datos y representaciones obtenidas en los experimentos 2 y 3, se confirma que el cultivo utilizado durante el tercer experimento está mejor adaptado en el frasco, en comparación con el del experimento 2, aunque éste último partía inicialmente con una mayor concentración de células.

Ambos experimentos demuestran la presencia simultánea de bacterias marinas, de este modo el cultivo se describe como no axénico. Las bacterias se benefician de la materia orgánica excretada por la microalga, en forma de mucílago. Pero a la vez, se consideran competidoras de los nutrientes inorgánicos (como N y P), presentes en el medio.

Aparte de comprobar el aumento de la concentración del cultivo, se estiman las dimensiones de la célula y se confirma también el aumento del tamaño celular. Las células de la fase final (t_{11}) tienen un tamaño mayor que las de la fase inicial (t_2). Este hecho refleja una mayor duplicación durante la fase exponencial, y cuando ya se dividen menos, en la fase estacionaria, tienden a incrementar el volumen celular.

También se observan formas celulares diferentes entre las réplicas y en los tres puntos del cultivo estudiado. En el tiempo inicial se ven formas más similares, en cambio, en el tiempo final se presencia más células amorfas y aberrantes.

Las células encontradas se clasificaron en 4 categorías: células vegetativas, las más abundantes; células pequeñas; quistes grandes; y quistes pequeños. Se desconoce cuál es la función fisiológica de las células pequeñas y de los quistes. Probablemente los quistes son formas de resistencia de corto (unas horas) a largo (unos días) período, pero no se ha podido determinar en nuestros experimentos. Los resultados obtenidos permiten identificar en qué momentos aparecen estos tipos de células y diseñar futuros estudios sobre el ciclo de vida.

Debido a que el presente estudio es una parte de una investigación más extensa (con muestras de toxinas y acrilato a analizar), los resultados y conclusiones obtenidos sobre la caracterización fisiológica, serán útiles y podrán complementar el estudio más exhaustivo de esta microalga.

6. REFERENCIAS

Accoroni S., Romagnoli T., Pichierri S., Colombo F., Totti C. (2012a) Morphometric analysis of *Ostreopsis* cf. *ovata* cells in relation to environmental conditions and bloom phases. *Harmful Algae* 19, pp. 15-22.

Accoroni S. (2012b) Ecology, morphological variability and life cycle stages of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* (tesis doctoral). *Università Politecnica delle Marche, Italia*.

Accoroni S., Romagnoli T., Pichierri S., Totti C. (2014) New insights on the life cycle stages of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*. *Harmful Algae* 34, pp. 7-16.

Aligizaki K., Nikolaidis G. (2006) The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the north Aegean Sea, Greece. *Harmful Algae* 5, pp. 717-730.

Aligizaki K., Katikou P., Milandri A., Diogene J. (2011) Occurrence of palytoxin-group toxins in seafood and future strategies to complement the present state of the art. *Toxicon* 57, pp. 390-399.

Álvarez J., Pedrol A., Parro I., Goxencia J., de Torres M., Manzanera M., Planas C., Cosculluela G., López A. (2005) Brote epidémico de sintomatología irritativa en Sant Andreu de Llavaneres: ¿el origen está en el agua del mar? *XXIII Reunión de la Sociedad Española de Epidemiología. Las Palmas de Gran Canaria, España. Gaceta Sanitaria* 19 Supplement 1, pp. 3-139.

Álvarez J. (2006) Documento interno del Sistema de Vigilancia de la Salud Pública de la Generalitat de Catalunya.

Amorim A., Veloso V., Penna A. (2010) First detection of *Ostreopsis* cf. *siamensis* in Portuguese coastal waters. *Harmful Algae News* 42, pp. 6-7.

Amzil Z., Sibat M., Chomérat N., Grosse H., Marco-Miralles F., Lemee R., Nézan E., Séchet V. (2012) Ovatoxin-a and palytoxin accumulation in seafood in relation to *Ostreopsis* cf. *ovata* blooms on the French Mediterranean coast. *Marine Drugs* 10, pp. 477-496.

Barroso García P., Rueda P., Parrón T., Marín P., Guillén J. (2008) Brote con síntomas respiratorios en la provincia de Almería por una posible exposición a microalgas tóxicas. *Gaceta Sanitaria* 22(6), pp. 578-584.

Battocchi C., Totti C., Vila M., Masó M., Capellacci S., Accoroni S., René A., Scardi M., Penna A. (2010) Monitoring toxic microalgae *Ostreopsis* (dinoflagellate) species in coastal waters of the Mediterranean Sea using molecular PCR-based

assay combined with light microscopy. *Marine Pollution Bulletin* 60, pp. 1074-1084.

Bennouna A., El Attar J., Abouabdellah R., Palma S., Penna A., Moita T. (2010) First records of *Ostreopsis* cf. *siamensis* in Moroccan Atlantic upwelling waters. *Harmful Algae News* 42, pp. 1-3.

Berdalet E., Tester P., Zingone A. (2012) GEOHAB Core Research Project: HABs in Benthic Systems. Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms. IOC of UNESCO and SCOR, Paris and Newark, pp. 64.

Berdalet E., Fleming L. E., Gowen R., Davidson K., Hess P., Backer L. C., Moore S. K., Hoagland P., Enevoldsen H. (2016) Marine harmful algal blooms, human health and wellbeing: challenges and opportunities in the 21st century. *J. Marine Biological Association of the United Kingdom* 96, pp. 61-91.

Bravo I., Vila M., Casabianca S., Rodríguez F., Rial P., Riobó P., Penna A. (2012) Life cycle stages of the benthic palytoxin-producing dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyceae). *Harmful Algae* 18, pp. 24-34.

Bravo I., Figueroa, I. (2014) Towards an ecological understanding of dinoflagellate cyst functions. *Microorganisms* 2, pp. 11-32.

Brescianini C., Grillo C., Melchiorre N., Bertolotto R., Ferrari A., Vivaldi B., Icardi G., Gramaccioni L., Funari E., Scardala S. (2006) *Ostreopsis ovata* algal blooms affecting human health in Genova, Italy, 2005 and 2006. *European Surveillance* 11(9).

Brissard C., Herrenknecht C., Séchet V., Hervé F., Pisapia F., Harcouet J., Lémée R., Chomérat N., Hess P., Amzil Z. (2014) Complex toxin profile of French Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* strains, seafood accumulation and ovatoxins prepurification. *Marine Drugs* 12, pp. 2851-2876.

Brissard C., Hervé F., Sibat M., Séchet V., Hess P., Amzil Z., Herrenknecht C. (2015) Characterization of ovatoxin-h, a new ovatoxin analog, and evaluation of chromatographic columns for ovatoxin analysis and purification. *J. Chromatography A* 1388, pp. 87-101.

Carlson R.D., Tindall D.R. (1985) Distribution and periodicity of toxic dinoflagellates in the Virgin Islands. In Toxic Dinoflagellates, Anderson D.M., White A.W., Baden D.G. (Eds.) *Elsevier Science*, New York. pp. 171-176.

Carnicer O., Guallar C., Andree, K.B., Diogène J., Fernández-Tejedor M. (2015) *Ostreopsis* cf. *ovata* dynamics in the NW Mediterranean Sea in relation to biotic and abiotic factors. *Environmental Research* 143, pp. 89-99.

- Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Magno S., Tartaglione L., Grillo C., Melchiorre N. (2006) The Genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Analytical Chemistry* 78, pp. 6153-6159.
- Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Tartaglione L., Grillo C., Melchiorre N. (2008) Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* collected along the Ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak. *J. American Society for Mass Spectrometry* 19, pp. 111-120.
- Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Grauso L., Tartaglione L. (2011) A 4-decade-long (and still ongoing) hunt for palytoxins chemical architecture. *Toxicon* 57, pp. 362-367.
- Deeds J.R., Schwartz M.D. (2010) Human risk associated with palytoxin exposure. *Toxicon* 56(2), pp. 150-162.
- Faust M.A., Morton S.L., Quod J.P. (1996) Further SEM study of marine dinoflagellates: The genus *Ostreopsis* (Dinophyceae). *J. Phycology* 32 (6), pp. 1053-1065.
- Fraga S., Rodríguez F., Bravo I., Zapata M., Marañón E. (2012) Review of the main ecological features affecting benthic dinoflagellate blooms. *Cryptogamie, Algologie* 33, pp. 171-179.
- Fukuyo Y. (1981) Taxonomical study on benthic dinoflagellates collected in coral reefs. *Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries* 47, pp. 967-978.
- Gallitelli M., Ungaro N., Addante L.M., Silver N.G., Sabbà C. (2005) Respiratory illness as a reaction to tropical algal blooms occurring in a temperate climate. *J. American Medical Association* 293, pp. 2599-2600.
- Giussani V., Sbrana F., Asnaghi V., Vassalli M., Faimali M., Casabianca S., Penna A., Ciminiello P., Dell'Aversano C., Tartaglione L., Mazzeo A., Chiantore M. (2015) Active role of the mucilage in the toxicity mechanism of the harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*. *Harmful Algae* 44, pp. 46-53.
- Glibert P., Pitcher G. 2001. GEOHAB Science Plan. Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms. SCOR and IOC, Baltimore and Paris, pp. 87.
- Gonzales R.B., Alcala A.C. (1977) Fatalities from crab poisoning on Negros Island, Philippines. *Toxicon* 15, pp. 169-170.

- Granéli E., Ferreira C.E.L., Yasumoto T., Rodrigues E.M, Neves B. (2002) Sea urchins poisoning by the benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* on the Brazilian Coast. *Proceedings of the 10th International Conference on Harmful Algae*, St. Pete Beach, Florida. Steidinger (Ed.) pp. 113.
- Guerrini F., Pezzolesi L., Feller A., Riccardi M., Ciminiello P., Dell'Aversano C., Tartaglione L., Iacovo E. D., Fattorusso E., Forino M., Pistocchi R. (2010) Comparative growth and toxin profile of cultured *Ostreopsis ovata* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas. *Toxicon* 55, pp. 211-220.
- Guillard R.R.L. (1973) Methods for microflagellates and nannoplankton. In Stein J.R. (Ed.) *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. London, Cambridge University Press, pp. 69-85.
- Guillard R.R.L. (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In Smith W.L. and Chanley M.H (Eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. New York, Plenum Press, pp. 26-60.
- Habermann E., Ahnert-Hilger G., Chhatwal G.S., Beres L. (1981) Delayed haemolytic action of palytoxin: general characteristics. *Biochimica et Biophysica Acta* 649, pp. 481-486.
- Hallegraeff G.M., Anderson D.M., Cembella A.D. (Eds.) (1995) Manual on Harmful Marine Microalgae. *IOC Manuals and Guides* 33 UNESCO.
- Hillebrand H., Dürselen C.-D., Kirschtel D., Pollinger U., Zohary T. (1999) Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J. Phycology* 35, 403-424.
- Honsell G., De Bortoli M., Boscolo S., Dell'Aversano C., Battocchi C., Fontanive G., Penna A., Berti F., Sosa S., Yasumoto T., Ciminiello P., Poli M., Tubaro A. (2011) Harmful dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* Fukuyo: Detection of ovatoxins in field samples and cell immunolocalization using antipalytoxin antibodies. *Environmental Science & Technology* 45, pp. 7051-7059.
- Honsell G., Bonifacio A., De Bortoli M., Penna A., Battocchi C., Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Sosa S., Yasumoto T., Tubaro A. (2013) New insights on cytological and metabolic features of *Ostreopsis* cf. *ovata* Fukuyo (Dinophyceae): a multidisciplinary approach. *PLOS ONE* 8(2), e57291.
- Hoppenrath M., Murray S.A., Chomérat N., Horiguchi T. (2014) Marine Benthic Dinoflagellates - Unveiling Their Worldwide Biodiversity. *Kleine Senckenberg-Reihe*, Band 54, Germany, 276 pp.
- Illoul H., Hernández F.R., Vila M., Adjias N., Younes A.A., Bournissa M., Koroghli A., Marouf, N., Rabia S. (2011) The genus *Ostreopsis* along the Algiers coastal

waters (SW Mediterranean Sea) associated with a human respiratory intoxication episode. In: Chiantore M., Lemée R., Mangialajo L. (Eds.) *International Conference on Ostreopsis Development*, April, Villefranche-sur-Mer, France, pp. 8.

IOC (Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO). (2010) Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. *Manuals and Guides*, 55.

Kang N.S., Jeong H.J., Sung Yeon Lee, Lim A.S., Lee M. J., Kim H.S., Yih W. (2013) Morphology and molecular characterization of the epiphytic benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* in the temperate waters off Jeju Island, Korea. *Harmful Algae* 27, pp. 98-112.

Laza-Martinez A., Orive E., Miguel I. (2011) Morphological and genetic characterization of benthic dinoflagellates of the genera *Coolia*, *Ostreopsis* and *Prorocentrum* from the south-eastern Bay of Biscay. *European Journal of Phycology* 46, pp. 45-65.

Mabrouk L., Hamza A., Brahim M.B., Bradai M.N. (2011) Temporal and depth distribution of microepiphytes on *Posidonia oceanica* (L.) Delile leaves in a meadow off Tunisia. *Marine Ecology* 32(2), pp. 148-161.

Mangialajo L., Ganzin N., Accoroni S., Asnaghi V., Blanfuné A., Cabrini M., Cattaneo-Vietti R., Chavanon F., Chiantore M., Cohu S., Costa E., Fornasaro D., Grosseil H., Marco-Miralles F., Masó M., Reñé A., Rossi A.M., Sala M.M., Thibaut T., Totti C., Vila M., Lemée R. (2011) Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts. *Toxicon* 57, pp. 408-420.

Moestrup Ø., Akselman R., Cronberg G., Elbraechter M., Fraga S., Halim Y., Hansen G., Hoppenrath M., Larsen J., Lundholm N., Nguyen L.N., Zingone A. (2009) IOC-UNESCO taxonomic reference list of harmful micro algae. Acceso: www.marinespecies.org/hab

Monti M., Minocci M., Beran A., Ives L. (2007) First record of *Ostreopsis* cf. *ovata* on macroalgae in the Northern Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 54, pp. 598-599.

Moore R.E., Bartolini G. (1981). Structure of palytoxin. *J. American Chemical Society* 103, pp. 2491-2494.

Nakajima I., Ochima Y., Yasumoto T. (1981) Toxicity of dinoflagellates in Okinawa. *B. of the Japanese Society for the Science of Fish* 47, pp. 1029-1033.

Norris D.R., Bomber J.W., Balech E. (1985) Benthic dinoflagellates associated with ciguatera from Florida Keys. I. *Ostreopsis heptagona* sp. nov In: Anderson D.M.,

White A.W., Baden D.G. (Eds.) *Toxic Dinoflagellates*. Elsevier Amsterdam, pp. 39-44.

Parsons M.L., Preskitt L.B. (2007) A survey epiphytic dinoflagellates from the coastal waters of the island of Hawaii. *Harmful Algae* 6 (5), pp. 658-669.

Parsons L.M., Aligizaki K., Dechraoui Bottein M.-Y., Fraga S., Morton L. S., Penna A., Rhodes L. (2012) *Gambierdiscus* and *Ostreopsis*: Reassessment of the state of knowledge of their taxonomy, geography, ecophysiology and toxicology. *Harmful Algae* 13, pp. 107-129.

Penna A., Vila M., Fraga S., Giacobbe M.G., Andreoni F., Riobó P., Vernesi C. (2005) Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the western Mediterranean Sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8S rDNA sequences. *J. Phycology* 41, pp. 212-225.

Pfannkuchen M., Godrijan J., Pfannkuchen D. M., Iveša L., Kružić P., Ciminiello P., Dell'Aversano C., Iacovo E.D., Fattorusso E., Forino M., Tartaglione L., Godrijan M. (2012) Toxin producing *Ostreopsis* cf. *ovata* are likely to bloom undetected along coastal areas. *Environmental Science & Technology* 46, pp. 5574-5582.

Pfiester L.A., Anderson D.M. (1987) Dinoflagellate Reproduction. *The Biology of Dinoflagellates*; Taylor, F.J.R. (Ed.) Blackwell Scientific: Oxford, UK, pp. 611-648.

Quod J.P. (1994) *Ostreopsis mascarenensis* sp. nov. (Dinophyceae), dinoflagellé toxique associé a la ciguatera dans l'Océan Indien. *Cryptogamie, Algologie* 15 (4), pp. 243-251.

Reynolds C.S. (2007) Variability in the provision and function of mucilage in phytoplankton: facultative responses to the environment. *Hydrobiologia* 578, pp. 37-45.

Rhodes L., Towers N., Briggs L., Munday R., Adamson J. (2002) Uptake of palytoxin-like compounds by shellfish fed *Ostreopsis siamensis* (Dinophyceae). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 36 (3), pp. 631-636.

Rhodes L. (2011) World-wide occurrence of the toxic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt. *Toxicon* 57, pp. 400-407.

Riobó P., Paz B., Franco J.M. (2006) Analysis of palytoxin-like in *Ostreopsis* cultures by liquid chromatography with precolumn derivitization and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* 566, pp. 217-223.

Sansoni G., Borghini B., Camici G., Casotti M., Righini P., Rustighi C. (2003) Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* (Gonyaulacales: Dinophyceae): un problema emergente. *Biol. Amb.* 17, pp. 17-23.

Schmidt J. (1902) Flora of Koh Chang, Contribution to the knowledge of the vegetation in the Gulf of Siam. Part IV. Peridinales. *Journal de botanique* 23, pp. 212-218.

Selina M.A., Orlova T.Y. (2010) First occurrence of the genus *Ostreopsis* (Dinophyceae) in the Sea of Japan. *Botanica Marina* 53, pp. 243-249.

Shears N.T., Ross P.M. (2009) Blooms of benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis*; an increasing and ecologically important phenomenon on temperate reefs in New Zealand and worldwide. *Harmful Algae* 8, pp. 916-925.

Taylor F.J.R. (1979) A description of the benthic dinoflagellate associated with maitotoxin and ciguatoxin, including observations on Hawaiian material. In: Taylor D.L., Selinger H.H. (Eds.) *Toxic dinoflagellate blooms*. Elsevier North Holland, New York, pp. 71-76.

Tichadou L., Glaizal M., Armengaud A., Grossel H., Lemée R., Kantin R., Lasalle J.-L., Drouet G., Rambaud L., Malfait P., de Haro L. (2010) Health impact of unicellular algae of the *Ostreopsis* genus blooms in the Mediterranean Sea: experience of the French Mediterranean coast surveillance network from 2006 to 2009. *Clinical Toxicology* 48 (8), pp. 839-844.

Tindall D.R., Morton S.L. (1998) Community dynamics and physiology of epiphytic/benthic dinoflagellates associated with ciguatera. In: D.M. Anderson, A.D. Cembella & G.M. Hallegraeff (Eds.) *Physiological ecology of harmful algal blooms*. Proc. NATOASI 41, Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 293-313.

Tognetto L., Bellato S., Moro I., Andreoli C. (1995) Occurrence of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) in the Tyrrhenian Sea during summer 1994. *Botanica Marina* 38, pp. 291-295.

Totti C., Accoroni S., Cerino F., Cucchiari E., Romagnoli T. (2010) *Ostreopsis ovata* bloom along the Conero Riviera (northern Adriatic Sea): Relationships with environmental conditions and substrata. *Harmful Algae* 9, pp. 233-239.

Turki S. (2005) Distribution of toxic dinoflagellates along the leaves of seagrass *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa* from the Gulf of Tunis. *Cahiers de Biologie Marine* 46 (1), pp 29-34.

Turquet J., Quod J.-P., Ten-Hage L., Dahalani Y., Wendling B. (2001) Example of a *Gambierdiscus toxicus* flare-up following the 1998 coral bleaching event in Mayotte Island (Comoros, south-west Indian Ocean). In: Hallegraeff G.M.,

Blackburn S.I., Bolch C.J., Lewis R.J. (Eds.) *Harmful Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO*, pp. 364-366.

Vanucci S., Guidi F., Pistocchi R., Long R.A. (2016) Phylogenetic structure of bacterial assemblages co-occurring with *Ostreopsis* cf. *ovata* bloom. *Harmful Algae* 55, pp. 259-271.

Vila M., Camps J., Garcés E., Masó M., Delgado M. (2001a) High resolution spatio-temporal detection of potentially harmful dinoflagellates in confined waters of the NW Mediterranean. *J. of Plankton Research* 23, pp. 497-514.

Vila M., Garcés E., Masó M. (2001b) Potentially toxic epiphytic dinoflagellates assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean. *Aquatic Microbial Ecology* 26, pp. 51-60.

Vila M., Masó M., Sampedro N., Illoul H., Arin I., Garcés E., Giacobbe M.G., Álvarez J., Camp J. (2008) The genus *Ostreopsis* in recreational waters of the Catalan coast and Balearic Islands (NW Mediterranean Sea): is this the origin of human respiratory difficulties? In: Moestrup O., et al. (Eds.) *Proceedings 12th International Conference on Harmful Algae*. UNESCO, Copenhagen, pp. 334-336.

Vila M., Riobó P., Bravo I., Masó M., Penna A., Reñé A., Sala M.M., Battocchi C., Fraga S., Rodriguez F., Franco J.M. (2010) A three-year time series of toxic *Ostreopsis* blooming in a NW Mediterranean coastal site: preliminary results. In Pagou P. and Hallegraeff G. (Eds.) *Proceeding of the 14th International Conference on Harmful Algae*. Copenhagen: ISSHA and IOC of UNESCO, pp. 111-113.

Vila M., Arin L., Battocchi C., Bravo I., Fraga S., Penna A., Reñé A., Riobó P., Rodriguez F., Sala M.M., Camp J., Torres M., Franco J.M. (2012) Management of *Ostreopsis* blooms in recreational waters along the Catalan coast (NW Mediterranean Sea): cooperation between a research project and a monitoring program. *Cryptogamie, Algologie*, 33 (2), pp. 143-152.

Vila M., Abós-Herrándiz R., Isern-Fontanet J., Álvarez J., Berdalet E. (2016) Establishing the link between *Ostreopsis* cf. *ovata* blooms and human health using ecology and epidemiology. *Scientia Marina* 80S1, pp. 107-115.

Yasumoto T., Seino N., Murakami Y., Murata M. (1987) Toxins produced by benthic dinoflagellates. *Biological Bulletin* 172, pp. 128.

Zingone A., Enevoldsen H.O. (2000) The diversity of harmful algal blooms: A challenge for science and management. *Ocean and Coastal Management* 43, pp. 725-748.

Zingone A., Siano R., D'Alelio D., Sarno D. (2006) Potentially toxic and harmful microalgae from coastal waters of the Campania region (Tyrrhenian Sea, Mediterranean Sea). *Harmful Algae* 5, pp. 321-337.