

**UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Informe escrito final

**Identificación taxonómica y distribución espacial de quistes de resistencia de
dinoflagelados nocivos, en el Golfo de Nicoya, Puntarenas, Costa Rica.**

**Proyecto de graduación presentado como requisito parcial para optar al grado de
Licenciatura en Biología con énfasis en Manejo de Recursos Marinos y Dulceacuícolas.**

Marianela Quirós Valerio

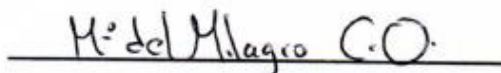
**Campus Omar Dengo
Heredia, 2020**

Miembros del Tribunal

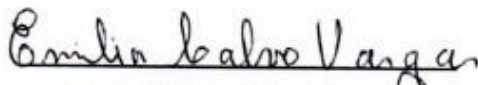
Este trabajo de graduación fue aprobado por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biología con Énfasis en Manejo de Recursos Marinos y Dulceacuícolas.



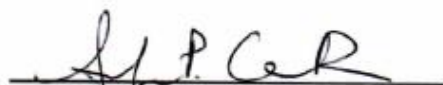
Licda. Nancy Villalobos Sandí
Representante, Decano, quién preside



M.Sc. Milagro Carvajal Oses
Representante, Unidad Académica



M.Sc. Emilia Calvo Vargas
Tutora



Dra. Andrea García Rojas
Asesora



Dra. Karol Ulate Naranjo
Invitada especial

Resumen

El Golfo de Nicoya es uno de los estuarios más productivos del mundo, se le considera un sitio de alto valor biológico, económico y turístico. No obstante, en los últimos años el incremento en los eventos de floraciones algales ha ocasionado pérdidas económicas para el sector productivo en la zona, por lo que determinar las áreas de distribución de quistes de resistencia puede brindar información para la implementación de futuras actividades productivas. Para realizar este estudio se determinaron un total de 21 estaciones de muestreo distribuidas tanto en la parte interna como externa del golfo. Para la determinación de la presencia de quistes se recolectaron muestras del sedimento marino con un nucleador por gravedad y preservadas en refrigeración. Posteriormente, se utilizó la técnica de separación por gradiente de densidad utilizando polytungstato de sodio para separar los quistes de los sedimentos. Se utilizó un microscopio invertido para revisar las muestras, realizar mediciones y tomar las microfotografías de los quistes. Los quistes viables se aislaron en cámaras multipocillos con medio de cultivo L1 y se colocaron en una incubadora para su germinación. La distribución de los quistes se graficó mediante el programa libre QGIS 3.0.0. En total se observaron 6405 quistes de los cuales 4138 tenían contenido celular viable. Se aislaron un total de 455 quistes. Se identificaron quistes de *Pyrodinium bahamense* var. *compresum*, *Alexandrium* sp., *Gyrodinium* sp., *Gonyaulax* sp., *Protoperidinium* sp, *Gymnodinium* cf. *catenatum*. y *Pheopolykrikos* sp. Las estaciones de muestreo ubicadas en Caldera y Tárcoles fueron las que presentaron una concentración mayor de quistes en los sedimentos, mientras que las estaciones en el interior del golfo cerca de Isla Chira registraron los valores más bajos. Se concluye que el presente estudio establece las bases para determinar la ubicación de los semilleros de especies potencialmente tóxicas y nocivas dentro del Golfo de Nicoya. Las zonas de Tárcoles, Caldera, Isla Cedros e Isla San Lucas, no serían áreas recomendables para el establecimiento de proyectos productivos al ser consideradas como zonas de alto riesgo debido a la posibilidad de floraciones algales recurrentes.

Agradecimiento

Un agradecimiento muy especial a mi profesora y tutora M.Sc. Emilia Calvo Vargas por su apoyo y entrega en cada paso de este proceso, agradezco su vocación como profesora, pero sobretodo agradezco su calidad humana y su genuino interés en que culmine esta etapa académica de la mejor manera. ¡Gracias Profe!

A mis asesoras Dra. Isabel Bravo Portela y Dra. Andrea García Rojas por su apoyo y observaciones para la finalización de este trabajo.

A la M.Sc. Rebeca Quesada Céspedes por el diseño de los mapas de distribución de los quistes de dinoflagelados en el Golfo de Nicoya.

Al personal docente y administrativo de la Escuela de Ciencias Biológicas, que de una manera u otra colaboraron en la realización del presente trabajo.

Dedicatoria

El presente trabajo está dedicado a mi familia y amigos que me brindaron todo su apoyo para concluir con éxito el presente documento.

Índice

Miembros del Tribunal	I
Resumen.....	II
Agradecimiento.....	III
Dedicatoria.....	IV
Índice	V
Índice de Cuadros	VII
Índice de Figuras.....	VIII
Abreviaturas	X
1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	4
1.2 Justificación	7
1.3 Objetivos.....	8
1.3.1 Objetivo General.....	8
1.3.2 Objetivos Específicos.....	8
2. Metodología	9
2.1 Área de estudio.	9
2.2 Estaciones de muestreo.	9
2.3 Recolección de las muestras de sedimentos marinos.	10
2.4 Separación de los quistes de resistencia del sedimento marino.	12
2.5 Aislamiento y germinación de los quistes de resistencia.	13
2.6 Microfotografías.	13
2.7 Descripción morfológica de los quistes de resistencia.....	14
2.8 Distribución de quistes de resistencia en el Golfo de Nicoya.	14
2.9 Crecimiento celular de <i>Pyrodinium bahamense</i> var. <i>compressum</i>	15
3. Resultados	16
3.1 Estaciones de muestreo	16
3.2 Quistes cuantificados en las muestras de sedimentos marinos.	19
3.3 Aislamiento y Cultivo de los quistes.....	20
3.4 Descripción morfológica de los quistes de resistencia.....	20
3.4.1 <i>Pyrodinium bahamense</i> var. <i>compressum</i>	21
3.4.2 <i>Gyrodinium</i> sp.....	24
3.4.4 Quiste Tipo I.....	27
3.4.5 <i>Gonyaulax</i> sp.	28

3.4.6 <i>Protoberidinium</i> sp.	28
3.4.6 <i>Gymnodinium cf. catenatum</i>	30
3.4.7 <i>Pheopolykrikos</i> sp.	30
3.5. Distribución de los quistes de resistencia en el Golfo de Nicoya.	31
3.5.1 Concentración total de quistes	31
3.5.2. Distribución de quistes de resistencia de <i>Pyrodinium bahamense</i> var. <i>compresum</i>	33
3.5.3. Distribución de quistes de resistencia de <i>Gyrodinium</i> sp.....	35
3.5.4 Distribución de quistes de resistencia de <i>Alexandrium</i> sp.	36
3.5.6 Distribución de quistes de resistencia de quiste Tipo I.....	38
4. Discusión.....	41
4.1 Características de las estaciones de muestreo.	41
4.2 Identificación de los quistes de resistencia	42
4.3 Distribución de quistes de resistencia en el Golfo de Nicoya.....	47
5. Conclusiones	49
6. Recomendaciones	50
7. Bibliografía	51
8. Anexos	59
Anexo 1. Coordenadas geográficas de las estaciones de muestreo, golfo de Nicoya, Puntarenas, Costa Rica.	59
Anexo 2. Técnica para la separación de quistes del sedimento con solución de polytungstato de sodio (SPS)(Bravo <i>et al.</i> 2007).	60
Anexo 3. Aislamientos celulares por micromanipulación capilar (Reguera 2002).....	61
Anexo 4. Preparación del medio de cultivo L1, (Guillard y Hargraves 1993).....	62

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Características físicas y químicas de las estaciones de muestreo durante el período abril de 2013 a abril de-2014, Golfo de Nicoya Puntarenas, Costa Rica.....	17
Cuadro 2. Quistes de resistencia viables, vacíos y totales de dinoflagelados en las muestras de sedimento durante el periodo abril 2013 a - abril 2014, Golfo de Nicoya, Puntarenas, Costa Rica.	19
Cuadro 3. Quistes de resistencia aislados de dinoflagelados nocivos durante el periodo abril 2013-abril 2014. Golfo de Nicoya. Puntarenas, Costa Rica.....	20

Índice de Figuras

- Figura 1. Ubicación geográfica de las estaciones de muestreo para el estudio de los quistes de dinoflagelados..... 10
- Figura 2. Recolección de muestras de sedimento marino: a) Nucleador por gravedad utilizado para recolectar las muestras de sedimento marino. b) y c) extracción del nucleador del agua. d) Tubo de acrílico con la muestra de sedimento extraído del interior del nucleador. e) Medición de la temperatura cerca del sedimento. f) etiquetado y almacenamiento de las muestras para ser transportadas al Laboratorio. 11
- Figura 3. Separación de quistes del sedimento marino: a) Separación de los sedimentos a través de una serie de tamices b) Resultado de la separación de los quistes de resistencia del sedimento a través de la técnica de separación por gradiente de densidad..... 12
- Figura 4. Metodología utilizada para la toma de microfotografías de los quistes aislados de los sedimentos marinos: a) Cámara digital conectada al microscopio invertido. b) Microfotografía que muestra la escala utilizada para medir los quistes aislados..... 13
- Figura 5. Quistes de resistencia de *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*. a) quiste de forma semiesférica; b) distribución de los procesos sobre el perifragma; c) microreticulación del perifragma; d) Procesos oblate con la base bifurcada; e) quiste abierto posterior a la germinación (arqueopilo señala con flecha); f) detalle del arqueopilo epiquistal; g) endofragma (indicado por la flecha); h) citoplasma granular y cuerpo rojo en división. Barra de escala = 10 μm 21
- Figura 6. Quistes de *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*: a) división del cuerpo rojo en dos nuevas estructuras de igual tamaño; b) componentes del citoplasma celular; c) quiste viable con procesos aún sin desplegarse; d) quiste deteriorado con se degradación del citoplasma y el contenido celular se empieza a separar del endofragma; e, f, g, h) formación de gránulos de tamaños variables que van dando paso al proceso de degradación del quiste (indicado por la flecha). 22
- Figura 7. Células germinadas de *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* en cultivo: a) célula con pocas horas de haber germinado vista dorsal; b) vista lateral; c) célula en proceso de división, d) cadenas de 2 células después de 2 días de germinación del quiste; e) cadenas de 4 células una semana después de la germinación. 23
- Figura 8. Tasa de crecimiento de *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*. 24
- Figura 9. Quiste de *Gyrodinium* sp. a) quiste viable con planocigoto casi formado, se destaca el parasulcus; b) paracingulum y cuerpo pardo definido; c) quiste deteriorado con el interior degradado. Barra de escala = 10 μm 25
- Figura 10. Quiste de *Alexandrium* sp. a) quiste viable, con cuerpo naranja y citoplasma verdoso, cubiertos por una gruesa capa de mucílago; b) quiste deteriorado con el citoplasma con gránulos; c) quiste vacío; d) quiste sin capa de mucílago, con interior deteriorado. Barra de escala= 10 μm 26
- Figura 11 Quiste Tipo I: a) Quiste vacío con forma esférica cubierto con proyecciones del tipo acuminate, con se observa la pared completamente transparente en ausencia de contenido celular, b) quiste viable, con contenido celular color rojizo, c) quiste en proceso de degradación, expulsión de contenido celular luego de ser colocado en la cámara de incubación; d) formación de gránulos de lípidos en un quiste deteriorado, se observa un con espacio amplio entre el citoplasma y la pared celular; e y f) detalle del arqueópilo. Barra escala= 10 μm 27

Figura 12 a) Detalle de las trabéculas que conectan los puntos distales de las proyecciones del quiste, b) detalle de las bases de las proyecciones donde se evidencia la bifurcación, c) quiste sin contenido celular, pared celular translúcida. Barra escala 10 µm.	28
Figura 13. Quiste de <i>Protoperidinium</i> sp. Tipo 1. Barra escala= 10 µm.	29
Figura 14. Quiste de <i>Protoperidinium</i> sp. cf. <i>stellatum</i> . Barra de escala = 10 µm	29
Figura 15. Quiste de <i>Gymnodinium</i> cf. <i>catenatum</i> . a) arqueopilo b) microreticulaciones	30
Figura 16. Quiste de <i>Pheopolykrikos</i> sp. (Se indica las ramificaciones en las ornamentaciones)	30
Figura 17. Distribución espacial de los quistes aislados de los sedimentos: a) Distribución de los quistes de resistencia totales de dinoflagelados; b) Distribución de los quistes de resistencia viables, durante el periodo abril 2013 a abril 2014, Golfo de Nicoya, Puntarenas Costa Rica.	32
Figura 18. Distribución espacial de la concentración total de quistes de resistencia de <i>Pyrodinium bahamense</i> var. <i>compressum</i> durante el periodo abril 2013 a abril 2014, Golfo de Nicoya, Puntarenas Costa Rica.	33
Figura 19. Distribución espacial de la concentración de quistes de resistencia viables de <i>Pyrodinium bahamense</i> var. <i>compressum</i> durante el periodo abril 2013 a abril 2014, Golfo de Nicoya, Puntarenas Costa Rica.	34
Figura 20. Distribución espacial de la concentración de los quistes totales de <i>Gyrodinium</i> sp. durante el periodo	35
Figura 21. Distribución espacial de la concentración de los quistes viables de <i>Gyrodinium</i> sp. durante el periodo abril 2013 a abril 2014, Golfo de Nicoya, Puntarenas, Costa Rica.	36
Figura 22. Distribución espacial de la concentración de los quistes totales de <i>Alexandrium</i> sp. durante el periodo abril 2013 a abril 2014, Golfo de Nicoya, Puntarenas, Costa Rica.	37
Figura 23. Distribución espacial de la concentración de los quistes viables de <i>Alexandrium</i> sp. durante el periodo de abril 2013 a abril 2014, Golfo de Nicoya, Puntarenas, Costa Rica.....	38
Figura 24. Distribución espacial de la concentración de los quistes totales de Quiste Tipo I durante el periodo abril 2013 a abril 2014, Golfo de Nicoya, Puntarenas, Costa Rica.	39
Figura 25. Distribución espacial de la concentración de los quistes viables de Quiste Tipo I durante el periodo abril 2013 a abril 2014, Golfo de Nicoya, Puntarenas, Costa Rica.	40

Abreviaturas

<i>et al.</i>	Del Latín "et alia" que significa "y otros"
°C	Grados Celsius
µm	Micrómetros
µmol	Micromoles
cf	Con Forma
cm	Centímetros
cm ³	Centímetro cúbico
CRTM05	Sistema Oficial de Coordenadas de Costa Rica
DOI	Identificador de objetos digitales (Digital Object Identifier)
Fig	Figura
g	Gramos
GPS	Global Positioning System
h	Horas
ITEC	Instituto de tecnologías especializadas y Capacitación
K	Tasa Específica de Crecimiento
Km	Kilómetros
Km ²	Kilómetros cuadrados
L	Litros
LFM	Laboratorio de Fitoplancton Marino
L1	Medio de cultivo en agua de mar
Log 2	Logaritmo en base 2
m	Metros
mL	Mililitros
N°	Número
p	página
pp	páginas
PSP	Intoxicación Paralítica por Moluscos (por sus siglas en inglés)
rpm	Revoluciones por minuto
SIG	Sistema de Información Geográfica
sp	Especie
spp	Especies
SPS	Solución de Polytungstato de Sodio
T	Tiempo
UNA	Universidad Nacional
UPS	Unidades Prácticas de Salinidad
v	Volumen
var	Variedad
WGS84	Sistema Geodésico Mundial

1. Introducción

Las microalgas plantónicas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y se han adaptado a diferentes ambientes con una gran diversidad de tamaños, morfología, ciclos de vida, pigmentos fotosintéticos y metabolismo (Matsunaga *et al.* 2005). Son consideradas como la base de la pirámide alimenticia en todos los ecosistemas marinos (Brugnioli-Oliveira y Morales-Ramírez 2008).

Las microalgas son un grupo muy diverso de organismos, entre ellas se incluyen a los dinoflagelados, que forman parte importante de las comunidades fitoplanctónicas marinas (Harland 1988) y de agua dulce (Graham *et al.* 2009), ya que, poseen una alta diversidad ecológica (Bravo y Figueroa 2014). Su distribución está influenciada principalmente por factores ambientales tales como la temperatura superficial del mar, la salinidad y la concentración de nutrientes (Verleye *et al.* 2011). La mayor diversidad de especies se encuentra en las aguas tropicales y subtropicales (Lee 2008). Estos organismos se caracterizan por la presencia de dos flagelos dimórficos que les permiten desplazarse dentro de la columna de agua y un núcleo grande (Figueroa y Bravo 2005).

Los dinoflagelados plantónicos han sido objeto de múltiples estudios, al ser productores de toxinas muy potentes (Sar *et al.* 2002), lo cual se restringe a unas pocas especies pertenecientes a los géneros *Gymnodinium* (Anderson *et al.* 1988, Figueroa *et al.* 2006), *Alexandrium* (Yamaguchi *et al.* 2002, Figueroa *et al.* 2007), *Lyngulodinium* (Morales-Ramírez *et al.* 2001) y *Pyrodinium* (Usup *et al.* 2012). Otras especies de microorganismos fitoplanctónicos que también presentan capacidad para la producción de toxinas son *Dinophysis* spp., *Prorocentrum lima*, *Protoceratium reticulatum*, *Gonyaulax spinnifera*, *Goniaulax taylori*, *Amphidoma languida*, *Karenia brevis*, *Gambierdiscus* spp., *Ostreopsis* sp. y *Palythoa* spp. (Anderson *et al.* 2014 modificado por Salgado 2017). La naturaleza química de estas ficotoxinas es muy diversa y compleja, y a través de diferentes vectores pueden ser transferidas a los diferentes niveles tróficos hasta llegar al ser humano, causando una gran variedad de cuadros de intoxicaciones (Etheridge 2010, Martínez 2011, Wong *et al.* 2011).

Los dinoflagelados, presentan un ciclo de vida con una fase móvil que se alimenta y se desplaza dentro de la columna de agua y una fase de reposo donde la célula permanece en un estado inactivo, pierde los flagelos formando quistes o formas de resistencia (Matsuoka y

Fukuyo 2000, Graham *et al.* 2009, Cucchiari *et al.* 2010). El quiste temporal o pellicle, tiene una pared delgada que se forma a partir de la capa pellicle de la célula vegetativa, carece de un periodo de latencia y su origen puede ser mediante reproducción sexual o asexual (Bravo y Figueroa 2014).

El quiste de resistencia consta de una pared gruesa formada por una o más capas, un cuerpo de acumulación de pigmentos celulares que pueden variar entre el naranja al marrón (Bravo *et al.* 2010), citoplasma granular (Bravo *et al.* 2007) y principalmente se producen por reproducción sexual, en la cual hay fusión de los gametos, se forma un planocigoto y posteriormente un hipnocigoto o quiste de resistencia (Matsuoka y Fukuyo 2000, Graham *et al.* 2009). Este conjunto de características fisiológicas permite que los quistes de resistencia se mantengan viables en los sedimentos por largos periodos de latencia (Bravo y Figueroa 2014). Esta acumulación de quistes se denomina cama o semillero y a menudo determinan donde ocurren las floraciones algales (Brosnahan *et al.* 2020), ya que, una vez que los quistes pasan por este periodo de inactividad acumulados en los sedimentos, germinan para eventualmente dividirse y formar células vegetativas nuevas (Baula *et al.* 2011).

Algunos parámetros físico-químicos, como la temperatura y la disponibilidad de oxígeno actúan como desencadenantes exógenos para la germinación de los quistes en reposo, afectando incluso los periodos de latencia (Brosnahan *et al.* 2020). Además, las condiciones de luz y oxígeno en los niveles superficiales de los sedimentos favorecen la germinación exitosa de los quistes (Figueroa *et al.* 2018). Versteegh y Zonneveld (2002) consideran también que la cantidad de oxígeno disponible dentro de los sedimentos puede incidir en los procesos de descomposición de materia orgánica, incluyendo la degradación de los quistes de resistencia. No obstante, Zonneveld *et al.* (2001), han determinado que algunas especies de dinoflagelados producen quistes que toleran la oxidación, a pesar de que su pared celular está compuesta principalmente por materia orgánica.

Los eventos de perturbación dentro de los sedimentos también pueden funcionar como un factor para iniciar las floraciones (Anderson *et al.* 2005, Hereid 2007). Los organismos como poliquetos, larvas, cangrejos e incluso las actividades humanas entre otros, ocasionan perturbaciones en el sedimento que pueden resuspender los quistes sepultados, si no fuera por estas perturbaciones, únicamente una pequeña parte de los quistes podrían germinar (Blanco 1988).

La producción de quistes de resistencia tiene implicaciones ecológicas importantes para los dinoflagelados:

- Sobrevivencia de la especie ante condiciones adversas (Sarjeant *et al.* 1987, Yamaguchi *et al.* 2002): cambios en la temperatura, duración del día y disponibilidad de nutrientes en la columna de agua (Peña-Manjarrez *et al.* 2001).
- Facilitar la recombinación genética de la población, mediante la formación de quistes de resistencia a partir de la fusión de células sexuales (Bravo *et al.* 2007)
- Ampliar la distribución geográfica de las especies, mediante el transporte de quistes por corrientes marinas (Sarjeant *et al.* 1987, Matsuka y Fukuyo 2000). En el caso de quistes con proyecciones o rodeados de mucílago es posible que se adhieran a objetos u organismos marinos que los pueden transportar a otras áreas (Anderson y Wall 1978, Sarjeant *et al.* 1987). La dispersión de los quistes también se ve favorecida por medio de las aguas de lastre de los barcos.
- Funcionar como un inóculo para el inicio de futuras poblaciones (Garcés *et al.* 2004, Bravo *et al.* 2010, Figueroa *et al.* 2011). Sin embargo, también pueden contribuir al término de una floración algal por la disminución de las células vegetativas dentro de la columna de agua (Matsuoka y Takeuchi 1995, Kremp y Heisaken 1999, Wong *et al.* 2011, Figueroa *et al.* 2011, Lopez *et al.* 2019).
- Protección ante la depredación, ya que, el quiste puede ser más resistente ante la depredación que las células vegetativas, debido a la constitución química de la pared celular, la forma y el desarrollo de proyecciones (Sarjeant *et al.* 1987, Regenfors *et al.* 1998).

Además del estudio de distribución y abundancia de los quistes dentro del sedimento, el cálculo de la tasa de crecimiento en cultivos aislados brinda información sobre los requerimientos de cada especie para alcanzar un desarrollo óptimo (Omura y Fukuyo 2002). Comprender mejor la fisiología de estos organismos, desde la germinación del quiste hasta el establecimiento de estos cultivos, es de gran utilidad para predecir los futuros eventos de floraciones algales (Gedaria *et al.* 2007, Liu *et al.* 2020).

1.1 Antecedentes

Alrededor de 1830, se registraron los primeros fósiles de quistes de resistencia de dinoflagelados como incrustaciones en rocas (Sarjeant *et al.* 1987). A principios del siglo XX, se realizaron los primeros estudios de quistes fósiles de dinoflagelados en estudios del tipo bioestratificado. Sin embargo, no es hasta 1940 y 1950 que se publicaron los primeros trabajos donde se confirma la identidad de esos quistes fosilizados como formas de resistencia de dinoflagelados (Bravo y Figueroa 2014). Posteriormente a mediados de los años sesenta y principios de los setenta, cobra relevancia el estudio de los quistes y los procesos de enquistamiento y germinación de los dinoflagelados modernos (Wall y Dale 1968). En esta misma década, se reportó la formación de quistes como producto de la fusión de los gametos, lo cual permitió establecer una conexión del proceso de enquistamiento con la fase sexual del ciclo de vida de los dinoflagelados (Bravo y Figueroa 2014).

En la década de 1980, se realizaron numerosos estudios sobre los aspectos morfológicos, por ejemplo, en Canadá se realizaron estudios sobre la “paratabulación” de los quistes de dinoflagelados. Estos rasgos morfológicos consisten en las líneas y suturas, distribución de las proyecciones y el tipo de arqueopilo (Sarjeant *et al.* 1987). El análisis de la tabulación, paratabulación y los patrones de crecimiento, brindaron las bases fundamentales para intentar reconstruir la línea evolutiva de los dinoflagelados (Bujak y Williams 1981, Sarjeant *et al.* 1987). Por otro lado, Anderson *et al.* (1988), realizaron la descripción del quiste de resistencia de *Gymnodinium catenatum*, lo cual tuvo implicaciones importantes respecto a la dinámica de las floraciones de esta especie y su distribución geográfica.

En 1992, en la Región de Magallanes, Chile, se realizó el primer estudio de distribución de quistes de resistencia en los sedimentos marinos, como complemento a un programa de muestreo (Braun 1992), y en un estudio posterior realizado en 1994, se logró estimar la abundancia y un registro fotográfico de los quistes de *Protoperidinium* spp. y Gonyaulacoides. Luego en 1996 y 1997, se estudiaron los quistes de *Alexandrium catenella*, por ser esta especie una de las principales causantes de floraciones algales tóxicas de tipo paralizante (Lembeye 2004).

Desde comienzos del siglo actual, los estudios sobre quistes de dinoflagelados han profundizado en el conocimiento del papel de estas formas en la dinámica de las floraciones. Así, por ejemplo, en 2000 se reportó por primera vez la presencia de quistes de dinoflagelados

en la Bahía de Todos los Santos en México, en áreas con profundidades inferiores a los 25 m y sedimentos finos. Se identificó, al dinoflagelado *Lingulodinium polyedrum* como la especie dominante tanto en los sedimentos como en la columna de agua (Peña-Manjarrez *et al.* 2001).

En 2008, se realizó un estudio *in situ* en Northport Harbor, EE. UU. sobre el ciclo de vida de *Alexandrium fundyense* (actualmente *A. catenella*) durante una floración. Se confirmó la función de los quistes de resistencia como inóculos de células vegetativas en el desarrollo de una proliferación y la importancia del enquistamiento para mantener la población de *A. fundyense*. Además, se observó el enquistamiento coincidiendo con las mayores concentraciones de células vegetativas en la columna de agua, así como, el papel que representó para la acumulación de los quistes en el sedimento (Anglés *et al.* 2012).

Durante un trabajo realizado en sedimentos superficiales de la Bahía de Quatermaster Harbor, Washington, Estados Unidos de Norteamérica, en 2006, Tobin y Horner (2011) determinaron que los quistes de resistencia de *A. catenella*, tienen la capacidad de repoblar la columna de agua con células vegetativas en periodos de tiempo muy cortos, asociándolo con la presencia de toxinas en mariscos que provocó la suspensión de la comercialización de los moluscos durante el invierno, a pesar de que no es común la presencia de altas concentraciones de células móviles durante esta época.

Wong *et al.* (2011), reportaron una estacionalidad marcada en las densidades de quistes depositados en los sedimentos colectados en la Bahía Daya en China, siendo las épocas con mayor abundancia de quistes aquellas donde ocurrieron los picos más altos de floraciones, coincidiendo el aumento de los quistes en el sedimento con el declive de la floración. Este comportamiento concuerda con lo reportado por varios autores, en cuanto a la función primordial que pueden tener los quistes de resistencia como iniciadores y finalizadores de algunas floraciones de dinoflagelados (Baula *et al.* 2011).

En 2008, Gracia *et al.* (2013), estudiaron la distribución espacial y la viabilidad de los quistes de resistencia de *Alexandrium tamarense*, en los sedimentos superficiales de la Bahía de San Lawrence, al este de Canadá. En este estudio, se determinó la acumulación de quistes en lugares donde se observaron floraciones algales tóxicas recurrentes. Estos autores, destacaron la importancia de realizar estudios de la abundancia de quistes en los sedimentos superficiales como un instrumento que ayude a comprender mejor los futuros eventos de floraciones algales.

En 2009 Mizanoyo *et al.* (2012), realizaron un trabajo sobre la viabilidad de los quistes de resistencia de *A. tamarense* en los sedimentos de Bahía Fuka, Japón. Estos autores utilizaron metodologías moleculares para su identificación a nivel de especie y la utilización de radioisótopos para determinar la edad de los mismos, que en algunos casos tenían 100 años.

Recientemente Li *et al.* (2019), realizaron un estudio de distribución de quistes de resistencia en los sedimentos de la Bahía Daya al sur de China, donde pudieron determinar la acumulación de quistes de resistencia principalmente de *Lingulodinium polyedrum*, *Gymnodinium catenatum* y *Alexandrium* spp, considerando que es un riesgo potencial para la formación de floraciones algales nocivas dentro de la bahía, por lo que también destacaron el monitoreo de los quistes de resistencia de dinoflagelados como crucial en las áreas de maricultura. Morquecho (2019) recaló la importancia de tener registros permanentes de la abundancia de especies nocivas, así como, sus impactos en la salud humana y en el medio ambiente. Además, consideró que la información actual en México y América Latina sobre las dinámicas de las floraciones algales y sus características ecológicas son insuficientes para una prevención y mitigación de los efectos nocivos.

En 2019 Liu *et al.* (2020), analizaron muestras de agua y sedimentos en el Estrecho de Taiwán, aislaron células y quistes de *Gymnodinium catenatum* para comprender el origen de una floración y determinar el potencial de floraciones en los años siguientes. Posterior a la germinación de los quistes los investigadores determinaron la tasa de crecimiento en 0.5 divisiones/día, y concluyeron que este valor tan alto pudo favorecer la persistencia de células en la columna de agua que originó la floración algal.

En Costa Rica, Víquez (1999) reportó la presencia de quistes de resistencia de varias especies de dinoflagelados en el Golfo de Nicoya, entre ellos *Lingulodinium* sp, *Alexandrium* sp., *Protoperidinium* sp., y *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* que representó el 25 % de los quistes totales observados. Además, concluyó que los quistes de resistencia viables de este dinoflagelado tóxico se ubicaron principalmente en la parte media y externa del golfo coincidiendo con la mayor abundancia de las células vegetativas y con los sedimentos finos.

Posteriormente Morales-Ramírez *et al.* (2001), describieron morfológicamente el quiste de resistencia de *Lingulodinium polyedrum*, observado durante el monitoreo de una floración de esta especie en Bahía Culebra, Golfo de Papagayo. Además, los autores destacaron que a pesar de que *L. polyedrum* presentó una tasa de germinación baja, recomendaron determinar la ubicación de los puntos donde hay acumulación de quistes de resistencia y los factores

ambientales que pueden influir en su germinación, con el fin de comprender mejor el comportamiento estacional de la especie, los sitios donde inician las floraciones y la densidad que podrían alcanzar.

1.2 Justificación

El Golfo de Nicoya es uno de los estuarios más productivos del mundo, ya que, posee una gran riqueza pesquera, y además se le considera un sitio de alto valor biológico debido a la amplia diversidad de especies que alberga. Estas características, han permitido que parte de la población de la zona costera obtenga su sustento económico a partir de las actividades de extracción de productos marinos, turismo y proyectos de maricultura que se han venido desarrollando en los últimos años. Sin embargo, todas estas actividades se han visto afectadas en algún momento por eventos de floraciones algales (Vargas-Montero y Freer 2002).

En 2000 se registró un evento de floración algal producido por *P. bahamense* var. *compressum*, 77 personas se intoxicaron al consumir carne de ostión vaca (*Spondylus calcifer*) contaminado con toxinas paralizantes, por lo que, las autoridades de salud y pesca costarricenses declararon veda para la comercialización y extracción de moluscos bivalvos en el litoral Pacífico. La atención de esta emergencia nacional se estimó en 300 millones de colones (Alfaro-Rojas *et al.* 2010). Estudios previos han demostrado que durante las dos últimas décadas las floraciones algales en el Golfo de Nicoya se han incrementado. Por ejemplo, en el periodo 2008-2010 se registraron 11 eventos, de los cuales el 73% ocurrieron durante la época lluviosa (Calvo *et al.* 2016) y en 2011, se emitieron siete comunicados de alerta por la Comisión Interinstitucional para la Prevención y Control de la Marea Roja en Costa Rica (Calvo-Vargas y Arguedas-Rodríguez 2012).

Determinar la ubicación de las camas de quistes utilizando muestras de los sedimentos superficiales es una metodología que está actualmente en curso en varias áreas alrededor del mundo (Reidhaar 2015, Van Hauwaert 2016, Figueroa *et al.* 2018). De esta forma, se tendrían identificadas las zonas de alto riesgo debido a la posibilidad de floraciones algales recurrentes.

La identificación taxonómica de los quistes de resistencia de dinoflagelados nocivos, la ubicación de las áreas donde se presentan los semilleros de estas especies en el golfo y la determinación de la tasa de crecimiento de las células vegetativas producto de la germinación

de los quistes, proporcionará información para comprender mejor la ecología de estas especies y la dinámica de eventos de floraciones algales futuros que podrían impactar sobre la salud pública y la economía de las zonas costeras (Peta *et al.* 2017), principalmente en la implementación y desarrollo de proyectos de maricultura en la zona.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Determinar las áreas de acumulación de quistes de resistencia y la tasa de crecimiento de las células germinadas de dinoflagelados nocivos, para establecer el potencial de dichas especies en la producción de floraciones algales recurrentes que tendrían un impacto sobre las actividades productivas en el Golfo de Nicoya.

1.3.2 Objetivos Específicos.

Caracterizar taxonómicamente los quistes de resistencia de dinoflagelados nocivos presentes en los sedimentos del Golfo de Nicoya.

Determinar la distribución espacial de los quistes de resistencia de dinoflagelados nocivos en el Golfo de Nicoya.

Determinar la tasa de crecimiento de los dinoflagelados nocivos obtenidos a partir de la germinación de los quistes de resistencia.

2. Metodología

2.1 Área de estudio.

El Golfo de Nicoya, es un estuario tropical de origen tectónico (Vargas 1995, Brugnoli 1998, Brugnoli y Morales 2001), con un área aproximada de 1500 Km² (Martínez 1988). Se extiende alrededor de 83 Km al norte, desde el Océano Pacífico hasta la desembocadura del río Tempisque (Lizano y Vargas 1996). La mayor parte de la línea costera interna del golfo, está bordeada por esteros y vegetación densa de manglar. Mientras que la línea costera de la parte externa se compone de bordes rocosos (Peterson 1960). En la parte interna, la profundidad promedio es de 3 a 5 m, mientras que en la parte externa se han registrado profundidades de hasta 200 m (Martínez 1988, Vargas 2001). El golfo, también se caracteriza por la presencia de fondos lodosos y arenosos, principalmente entre las islas Chira y Bejuco (Peterson 1960, Martínez 1988). Los aportes mayores de agua dulce provienen del río Tempisque en la parte norte y de los ríos Grande de Tárcoles y Barranca ubicados en el borde este del golfo (Lizano y Vargas 1996, Brenes *et al.* 2001). En general, la época seca se extiende desde diciembre hasta abril inclusive, mientras que la lluviosa abarca los meses de mayo a noviembre (Peterson 1960). Durante la época lluviosa la parte interna del golfo es muy estratificada en términos de temperatura y salinidad, mientras que en época seca esta zona presenta poca estratificación. La parte externa del golfo presenta una misma estratificación durante todo el año (Brenes *et al.* 2001).

2.2 Estaciones de muestreo.

Las estaciones de muestreo, se determinaron en base a estudios previos que se han desarrollado en el Laboratorio de Fitoplancton Marino (LFM) de la Estación de Biología Marina Juan Bertoglia Richards, Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional (Fig. 1). La recolecta de las muestras se realizó mediante el muestreo rutinario de laboratorio en las estaciones de Tárcoles, Caldera, Chomes, Punta Morales, Isla Cortezas e Isla Pajarita. Para la toma de muestras en las otras estaciones se programaron giras extraordinarias. durante el periodo comprendido entre abril de 2013 a abril de 2014.

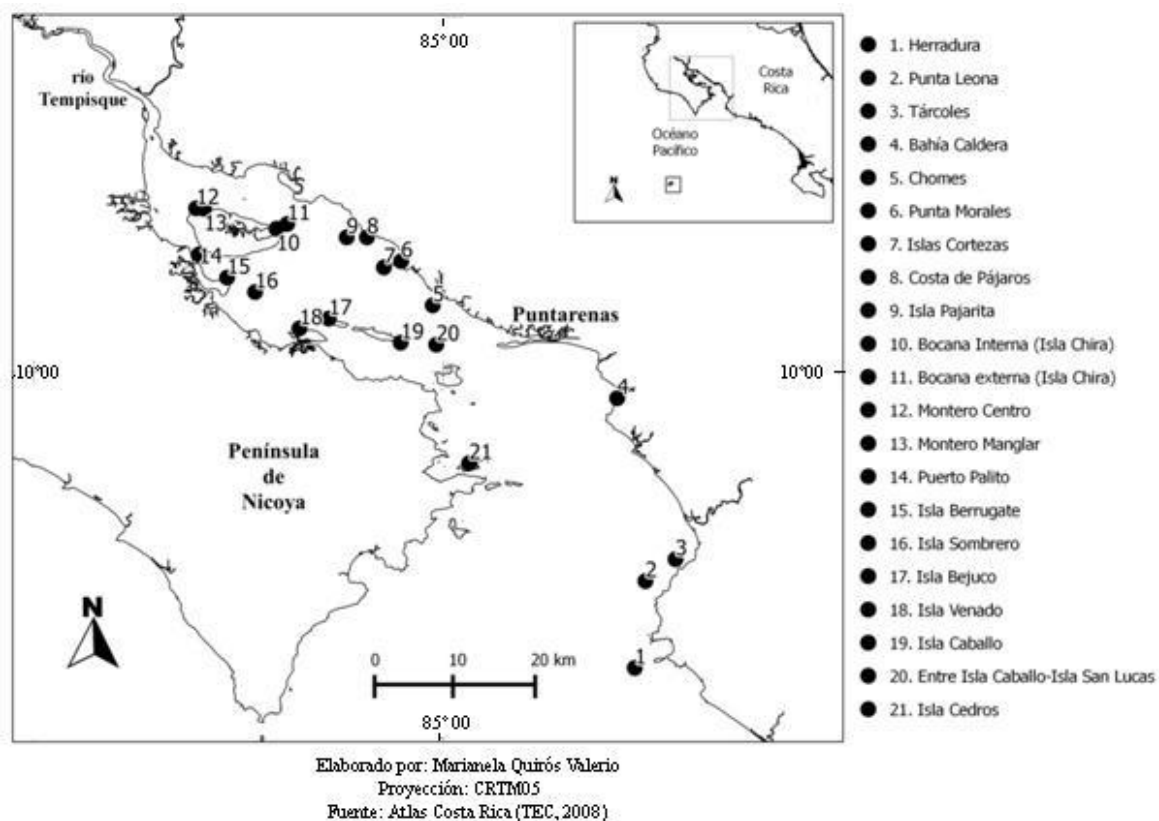


Figura 1. Ubicación geográfica de las estaciones de muestreo para el estudio de los quistes de dinoflagelados nocivos durante el periodo abril de 2013 a abril de 2014. Golfo de Nicoya, Puntarenas, Costa Rica.

2.3 Recolección de las muestras de sedimentos marinos.

Para llegar a cada estación de muestreo, se utilizó la embarcación Celeris, propiedad de la Universidad Nacional. Utilizando un GPS (GARMIN, modelo 62 S), se verificaron las posiciones geográficas de las estaciones de muestreo. Con un muestreador de sedimentos (nucleador por gravedad), se recolectaron las muestras de sedimento marino en 21 estaciones. Con un termómetro de inmersión ($\pm 1^\circ\text{C}$), se registró la temperatura de los mismos. Se utilizó un multiparámetros (YSI, modelo 556) para registrar los datos de salinidad. Los tubos de acrílico con las muestras de sedimentos se rotularon adecuadamente, (lugar, fecha y hora de muestreo), y se almacenaron en frío en una hielera para ser transportados al Laboratorio de Fitoplancton Marino, luego se colocaron en el refrigerador para su posterior análisis (Fig. 2).

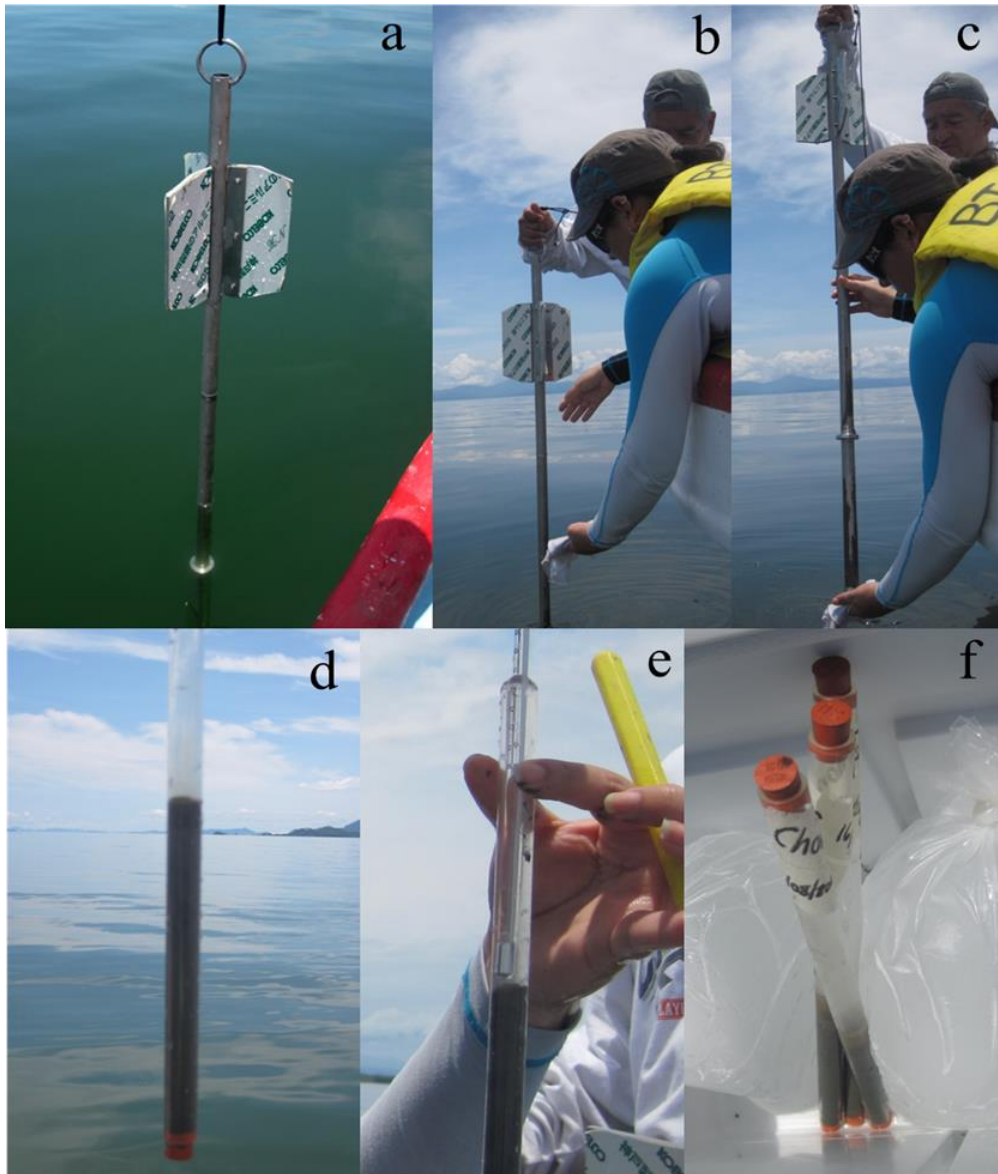


Figura 2. Recolección de muestras de sedimento marino: a) Nucleador por gravedad utilizado para recolectar las muestras de sedimento marino. b) y c) extracción del nucleador del agua. d) Tubo de acrílico con la muestra de sedimento extraído del interior del nucleador. e) Medición de la temperatura cerca del sedimento. f) etiquetado y almacenamiento de las muestras para ser transportadas al Laboratorio.

2.4 Separación de los quistes de resistencia del sedimento marino.

Para la separación de los quistes de los sedimentos marinos, se utilizó la técnica por gradiente de densidad, utilizando una solución de polytungstato de sodio con una densidad de 2g/mL, descrita por Bravo *et al.* (2007) (Anexo 2), para lo cual se utilizaron los primeros dos cm del núcleo de sedimento, posteriormente se pasaron por una serie de tamices (125 μm y 20 μm) y lavados para separar las partículas de mayor tamaño y luego se recuperó la fracción de sedimentos del tamiz de 20 μm (Fig. 3).

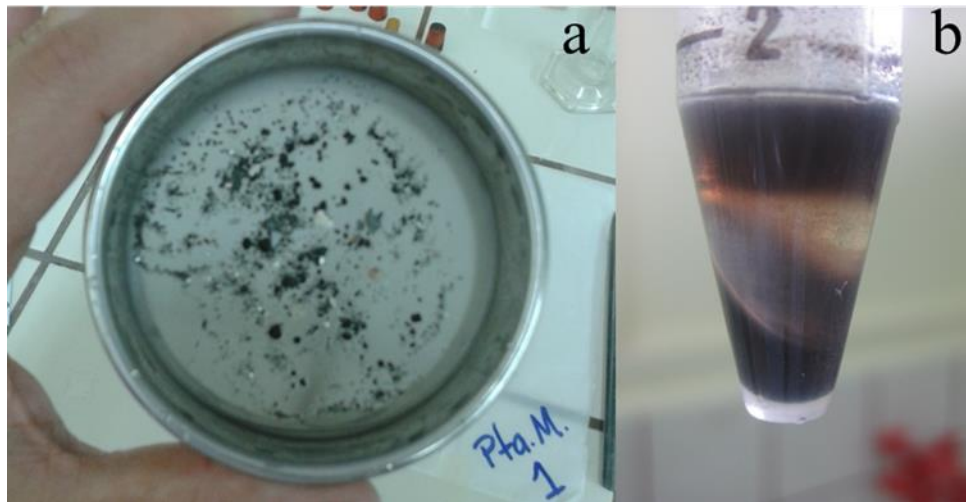


Figura 3. Separación de quistes del sedimento marino: a) Separación de los sedimentos a través de una serie de tamices b) Resultado de la separación de los quistes de resistencia del sedimento a través de la técnica de separación por gradiente de densidad.

2.5 Aislamiento y germinación de los quistes de resistencia.

El aislamiento de los quistes de resistencia se realizó mediante la técnica de micromanipulación capilar con algunas modificaciones (Reguera 2002) (Anexo 3), para ello se utilizó un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE 2000-S). La germinación de los mismos se desarrolló en placas de cultivo multipocillo conteniendo el medio de cultivo L1 (Anexo 4), se mantuvieron en una incubadora (GCL-805) con un fotoperiodo de 12 h luz: 12 h oscuridad, a una temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Para un seguimiento adecuado de cada uno de los quistes aislados, se realizaron observaciones periódicas, las cuales fueron anotadas en hojas de control.

2.6 Microfotografías.

Los quistes aislados, su germinación y las células vegetativas formadas, fueron fotografiadas con una cámara digital (Nikon, Coolpix 4500), incorporada al microscopio invertido y con los objetivos 60x ó 40x (Fig. 4).

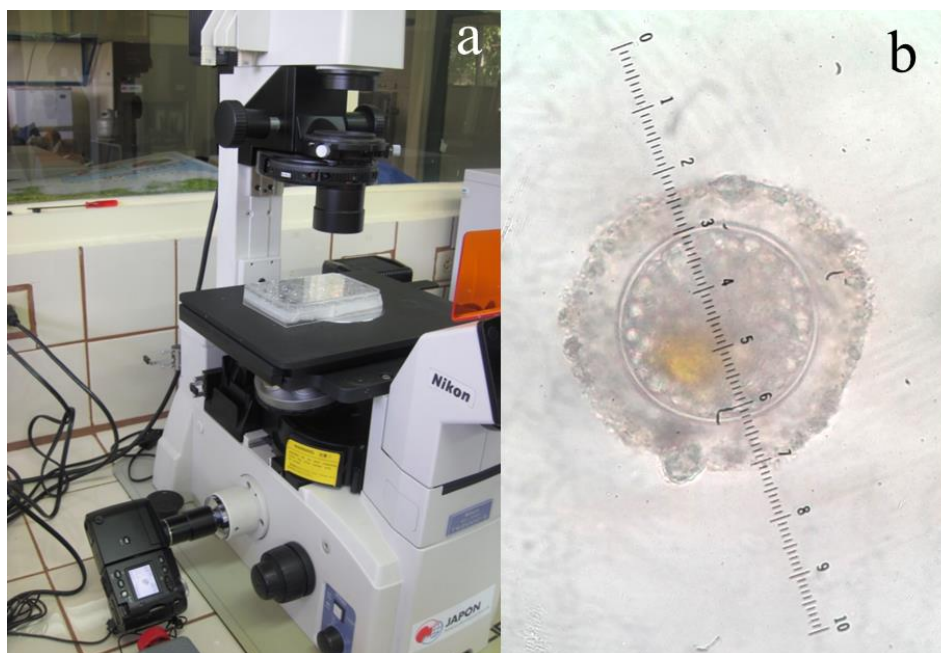


Figura 4. Metodología utilizada para la toma de microfotografías de los quistes aislados de los sedimentos marinos: a) Cámara digital conectada al microscopio invertido. b) Microfotografía que muestra la escala utilizada para medir los quistes aislados.

2.7 Descripción morfológica de los quistes de resistencia.

La descripción morfológica de los quistes de resistencia aislados, se basó en las siguientes características: tamaño y forma del cuerpo principal del quiste, tamaño y tipo de ornamentaciones, estructura y color de la pared y el tipo de arqueopilo (Matsuoka y Fukuyo 2000). Las mediciones del cuerpo principal del quiste y de las ornamentaciones, se realizaron mediante el uso de un micrómetro instalado en el microscopio invertido, utilizando el objetivo de 60x (Fig. 4). La identidad taxonómica de los quistes se confirmó con las características morfológicas de las células vegetativas producto de la germinación de cada quiste. Para el caso de los quistes que no germinaron se utilizó la Guía Técnica para el Estudio de Quistes de Dinoflagelados Actuales de Matsuoka y Fukuyo 2000, y artículos científicos según el género como se indica en la sección de resultados.

2.8 Distribución de quistes de resistencia en el Golfo de Nicoya.

Con la ayuda de un GPS (GARMIN, modelo 62 S), se ubicaron geográficamente las estaciones de muestreo en las cuales se registraron quistes de resistencia de dinoflagelados nocivos. Se realizaron mapas de distribución de los quistes viables y los vacíos, con la utilización de sistemas de información geográfica con el programa libre QGIS 3.0.0., a partir de los datos y utilizando la función de interpolación. Se utilizaron los valores de concentración promedio de los quistes por estación para elaborar los gráficos de manera que fuera posible apreciar mejor la distribución de los mismos.

Para determinar la concentración promedio de quistes en el sedimento en cada estación de muestreo, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración promedio de quistes por estación (Número de quistes/ mL)} = \frac{\text{Número de quistes/mL muestra de sedimento}}{\text{Número de muestras por estación}}$$

2.9 Crecimiento celular de *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*

Las células vegetativas obtenidas producto de la germinación de los quistes de *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*, se inocularon para obtener cultivos bajo condiciones controladas de laboratorio. La concentración inicial del inóculo fue de 400 células/mL en el medio de cultivo L1, y se mantuvieron a una temperatura de 26 ± 1 °C, salinidad de 31 UPS, intensidad lumínica de aproximadamente $68 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 24 h luz. Para determinar la tasa de crecimiento (divisiones/día) de este dinoflagelado, se tomaron muestras por duplicado del cultivo día por medio y se preservaron con solución de Lugol. Los conteos celulares se realizaron en cámaras Sedgwick-Raffter con la ayuda de un contador manual (modelo HT-1). Se promediaron los datos de los conteos y se calculó la desviación estándar. Para el cálculo de la tasa específica de crecimiento (K), se utilizó la siguiente fórmula (Hansen *et al.* 2007):

$$K \text{ (divisiones/días)} = (\log_2 N_2 - \log_2 N_1) / (T_2 - T_1)$$

Donde:

log = logaritmo en base 2

N_1 = número de células inicial

N_2 = número de células final

T_1 = tiempo inicial

T_2 = tiempo final

3. Resultados

3.1 Características de las Estaciones de Muestreo

En las estaciones de muestreo de Herradura (60 ± 03 m) y Punta Leona (54 ± 8.60 m), se registraron las mayores profundidades, mientras que en Tárcoles, Bahía Caldera, Chomes, Costa Pájaros, Isla Cortezas, Pajarita, Isla Sombrero e Isla San Lucas, la profundidad estuvo dentro del rango de los 16 m a 26 m. En las estaciones de Punta Morales, Isla Chira, Montero Centro y Montero Manglar, Puerto Palito, Isla Bejuco, Isla Venado, Isla Caballo e Isla Cedros, la profundidad fue menor o igual a los 10 m.

Los registros de salinidades también fueron variables, en Herradura (38 ± 0.71 UPS) y Punta Leona (38 ± 0.00 UPS) se registraron las salinidades más altas. Las estaciones Tárcoles, Bahía Caldera, Chomes, Punta Morales, Islas Cortezas, Pajarita, Isla Chira, Montero Manglar, Isla Venado, Isla San Lucas, Isla caballo e Isla Cedros tuvieron salinidades en un rango entre 30-34 UPS. En las estaciones de Costa Pájaros, Montero Centro, Isla Sombrero, Isla Berrugate e Isla Bejuco las salinidades se mantuvieron en rangos entre los 29 y 28 UPS, la estación de Puerto Palito (23 ± 2.31 UPS) fue donde se registró la menor salinidad.

En cuanto a la temperatura del sedimento, en la estación ubicada cerca de Puerto Palito se registró el valor más alto (33 ± 2.46 °C) y el más bajo en las estaciones de Herradura y Punta Leona (24 ± 0.00 °C). Las demás estaciones tuvieron temperaturas que oscilaron entre los 28° C y los 33°C.

Las únicas estaciones donde se recopilaban muestras de sedimentos marinos todo el año fue en Tárcoles y Bahía Caldera, en las demás estaciones por razones de logística o por clima no se pudieron tomar todas las muestras planificadas, por eso se detallan las épocas específicas de recolección. Con respecto al tipo de sedimento, predominó la presencia de sedimento arenoso fino o muy fino en la mayoría de las muestras de sedimento marino del golfo, sin embargo, en las estaciones de Chomes, Punta Morales y Puerto Palito se registraron sedimentos arenosos gruesos con restos de conchas. En el cuadro 1 se detallan cada una de las características físicas y químicas de las estaciones de muestreo.

Cuadro 1. Características físicas y químicas de las estaciones de muestreo durante el período abril de 2013 a abril de-2014, Golfo de Nicoya Puntarenas, Costa Rica.

Estación de muestreo	Profundidad (m)	Salinidad (UPS)	Temperatura del sedimento (° C)	N° de muestras recolectadas
Herradura	60±8.03	38±0.71	24±0.00	5
Punta Leona	54±8.60	38±0.00	24±0.00	5
Tárcoles	26±6.46	32±1.01	28±1.55	11
Bahía Caldera	17±6.65	32±1.58	30±0.25	15
Chomes	23±8.83	32±1.20	30±2.21	10
Punta Morales	4±1.43	32±1.65	31±0.45	6
Islas Cortezas	23±0.00	33±0.02	31±0.00	6
Costa de Pájaros	3±0.00	29±0.00	30±0.00	2
Isla Pajarita	16±0.23	34±1.56	30±0.25	4
Isla Chira (Bocana zona interna)	10±0.00	31±0.00	30±0.00	2
Isla Chira (Bocana zona externa)	8±0.00	31±0.00	30±0.00	2
Montero centro	3±0.00	28±0.00	30±0.00	2

Montero bordeado de manglar	3±0.00	32±0.00	31±0.00	2
Puerto Palito	10±0.00	23±2.31	33±2.46	2
Isla Sombrero	5±0.00	28±0.00	31±0.00	2
Isla Berrugate	7±0.00	28±0.00	30±0.00	2
Isla Venado	4±0.00	30±0.00	29±0.00	2
Isla Bejuco	9±2.31	29±0.00	29±0.29	4
Isla Caballo	6±2.08	30±0.00	29±0.29	4
Isla San Lucas	16±0.23	33±0.02	30±0.85	6
Isla Cedros	7±0.92	32±0.07	30±0.14	12

Continuación del cuadro 1.

3.2 Quistes cuantificados en las muestras de sedimentos marinos.

En total se observaron 6405 quistes, 4138 aún tenían contenido celular y 2267 estaban vacíos. Las estaciones de muestreo que presentaron el mayor número de quistes viables por mL fueron Tárcoles, Caldera, Punta Leona, Herradura e Isla Cedros. Mientras que las muestras recolectadas en las Islas Palito, Sombrero y Venado fueron las que registraron la menor cantidad de quistes (Cuadro 2).

Cuadro 2. Quistes de resistencia viables, vacíos y totales de dinoflagelados en las muestras de sedimento durante el periodo abril 2013 a abril 2014, Golfo de Nicoya, Puntarenas, Costa Rica.

Estación de muestreo	Quistes viables	Quistes vacíos	Total	Promedio de quistes/mL
Herradura	241	20	261	26±20.24
Punta Leona	317	18	335	34±33.34
Tárcoles	1401	240	1641	75±52.9
Bahía Caldera	1108	363	1471	49±45.19
Chomes	160	57	217	11±8.16
Punta Morales	43	79	122	10±6.91
Islas Cortezas	21	116	137	11±9.25
Costa de Pájaros	8	33	41	10±7.63
Isla Pajarita	27	254	281	35±25.34
Isla Chira (Bocana interna)	4	127	131	13±9.72
Isla Chira (Bocana externa)	4	96	100	25±15.76
Montero centro	0	40	40	10±7.52
Montero Manglar	0	39	39	10±5.59
Puerto Palito	0	4	4	1±0.81
Isla Sombrero	3	17	20	5±4.83
Isla Berrugate	6	119	125	31±15.64
Isla Venado	4	19	23	6±6.18
Isla Bejuco	19	85	104	13±12.1
Isla Caballo	23	96	119	15±10.21
Isla San Lucas	224	167	391	49±28.38
Isla Cedros	525	278	803	33±23.39
Total	4138	2267	6405	

3.3 Aislamiento y Cultivo de los quistes

En total se aislaron 455 quistes viables de dinoflagelados en las cámaras de cultivo, únicamente 41 lograron completar el proceso de germinación (Cuadro 3). *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* tuvo un porcentaje de germinación del 23.95%, lo que permitió confirmar la identidad taxonómica del quiste a través de la célula vegetativa germinada. Para *Alexandrium* sp. y de quiste Tipo I, no se logró observar la germinación de los quistes aislados. En el caso del quiste de *Gyrodinium* sp., a pesar de que sí germinó, no fue posible realizar la identificación de la célula vegetativa, ya que, murió poco después de germinar y no desarrolló completamente su morfología distintiva, por lo que la identificación se realizó utilizando como referencia el trabajo de Kojima y Kobayashi (1992), la guía de identificación de Matzuoka y Fukuyo (2000) y la comparación de quistes de *Gyrodinium* sp. de un cultivo del LFM.

Cuadro 3. Quistes de resistencia aislados de dinoflagelados nocivos durante el periodo abril 2013-abril 2014. Golfo de Nicoya. Puntarenas, Costa Rica.

Especie de dinoflagelado nocivo	Quistes aislados	Quistes germinados	% Germinación
<i>Pyrodinium bahamense</i> var. <i>compressum</i>	167	40	23.95
<i>Alexandrium</i> sp.	167	0	0.00
<i>Gyrodinium</i> sp.	35	1	2.86
Quiste tipo I	49	0	0.00
Especie no identificada	37	0	0.00
<i>Total</i>	455	41	26.81

3.4 Descripción morfológica de los quistes de resistencia.

A continuación, se detallan las características morfológicas distintivas de los quistes de dinoflagelados que fueron aislados y germinados.

3.4.1 *Pyrodictinium bahamense* var. *compressum*

El quiste de resistencia de *P. bahamense* var. *compressum*, presentó una forma semiesférica, con un diámetro entre los 41 a 66 μm , (promedio $55 \pm 3.89 \mu\text{m}$) (Fig. 5a). La pared del quiste incolora y conformada por dos capas; la externa (perifragma) presentó una superficie microreticulada y cubierta de procesos tubulares transparentes del tipo “oblate” cuya longitud fue de 5 a 12 μm (promedio $8.6 \pm 1.84 \mu\text{m}$), distribuidos de manera uniforme sobre la pared, en algunos casos se observó que el proceso tenía además una base bifurcada (Fig. 5b, c y d). La capa interna (endofragma) lisa y forma el cuerpo central del quiste (Fig. 5g). El arqueopilo de tipo epiquistal debido a que involucraba todas las placas del epiquiste (Fig. 5e y 5f).

El color del quiste fue dado por su contenido celular. En estado viable se observó un citoplasma granular con coloraciones amarillo verdosas y un cuerpo rojo brillante, mientras que el quiste deteriorado presentó gránulos de tonos naranjas translúcidos y un cuerpo rojo opaco, casi negruzco. Sin embargo, para ambos casos el tamaño del cuerpo rojo osciló entre los 9.9 a 21.5 μm (promedio $14.2 \pm 3 \mu\text{m}$) y ubicado en posición central o lateral (Fig. 5h).

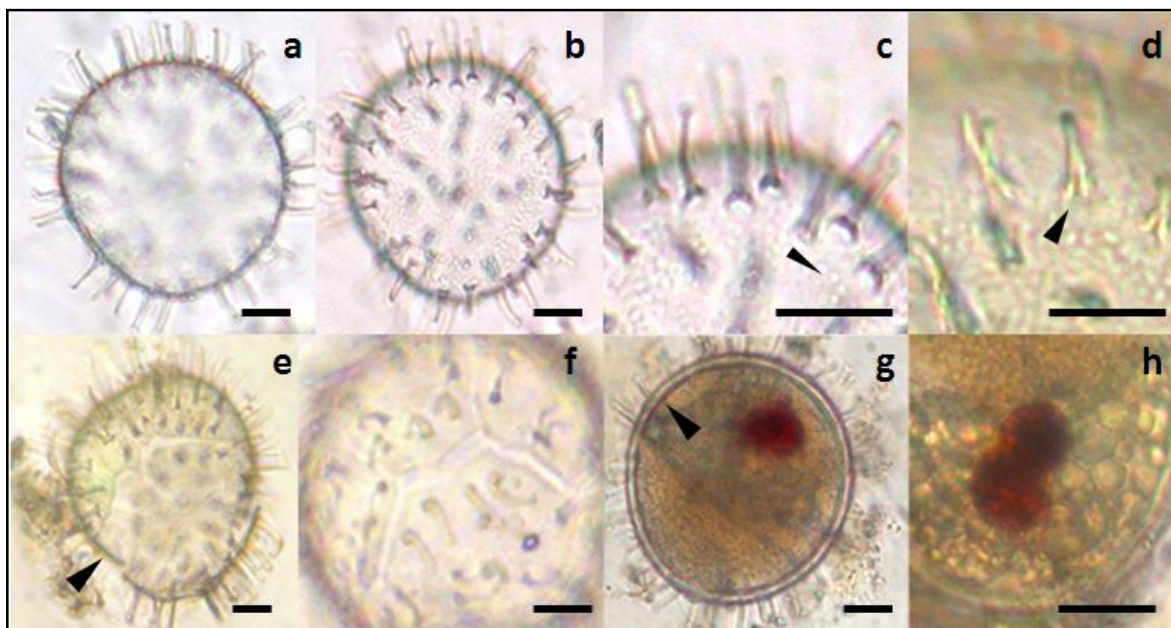


Figura 5. Quistes de resistencia de *Pyrodictinium bahamense* var. *compressum*. a) quiste de forma semiesférica; b) distribución de los procesos sobre el perifragma; c) microreticulación del perifragma; d) Procesos oblate con la base bifurcada; e) quiste abierto posterior a la germinación (arqueopilo señala con flecha); f) detalle del arqueopilo epiquistal; g) endofragma (indicado por la flecha); h) citoplasma granular y cuerpo rojo en división. Barra de escala = 10 μm .

Los quistes viables de *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*, que germinaron, la coloración del citoplasma varió entre amarillo claro a dorado, el cuerpo rojo se observó con mayor definición y es más brillante, el cuerpo completo del quiste se encontraba lleno, sin espacios entre el endofragma y el citoplasma (Fig. 6a y c). Por otro lado, un quiste deteriorado presenta grandes gránulos de tonos amarillos, verdosos y naranjas dentro del citoplasma que también se vuelve muy granular y adopta una coloración naranja opaco. El cuerpo rojo no es brillante, de tonos rojo oscuro y pierde su definición (Fig. 6d, e, f, g, h) Además, se comienza a dar la presencia de espacios vacíos dentro del citoplasma y separación entre el endofragma y el citoplasma (Fig. 6 b y d).

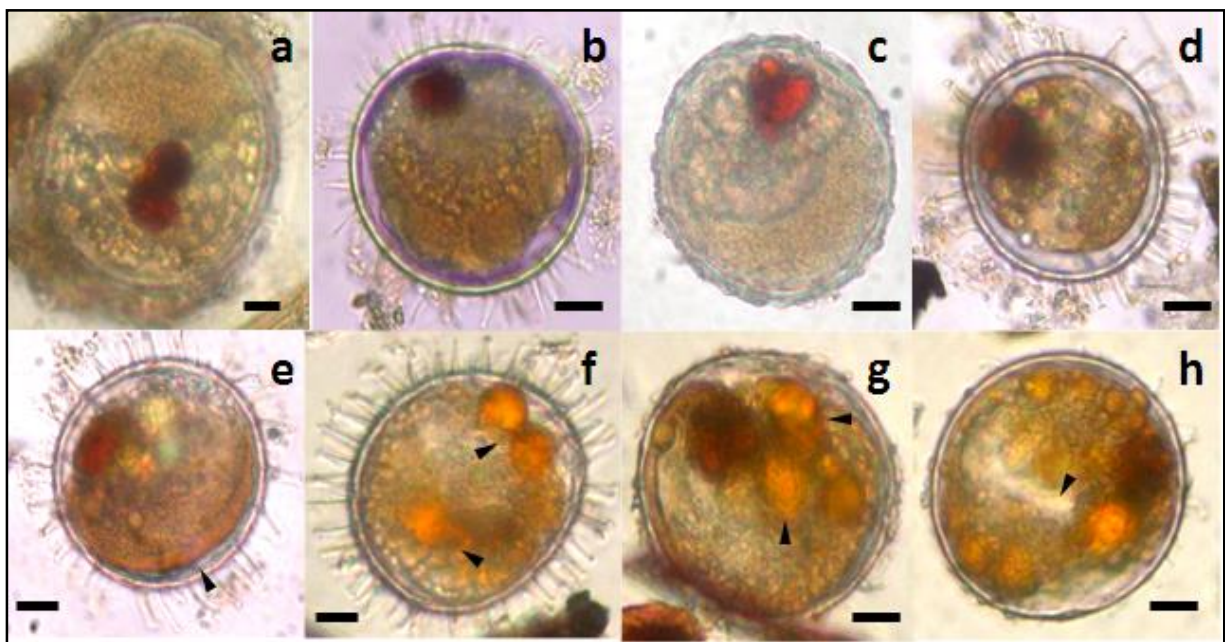


Figura 6. Quistes de *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*: a) división del cuerpo rojo en dos nuevas estructuras de igual tamaño; b) componentes del citoplasma celular; c) quiste viable con procesos aún sin desplegarse; d) quiste deteriorado con degradación del citoplasma y el contenido celular se empieza a separar del endofragma; e, f, g, h) formación de gránulos de tamaños variables que van dando paso al proceso de degradación del quiste (indicado por la flecha).

El tiempo estimado de germinación para esta especie varió entre 3 a 8 días. De cada quiste emergió un planomeiocito que aún mantenía el cuerpo rojo (Fig. 7). La identificación taxonómica se realizó una vez que la célula germinada alcanzó su morfología característica.

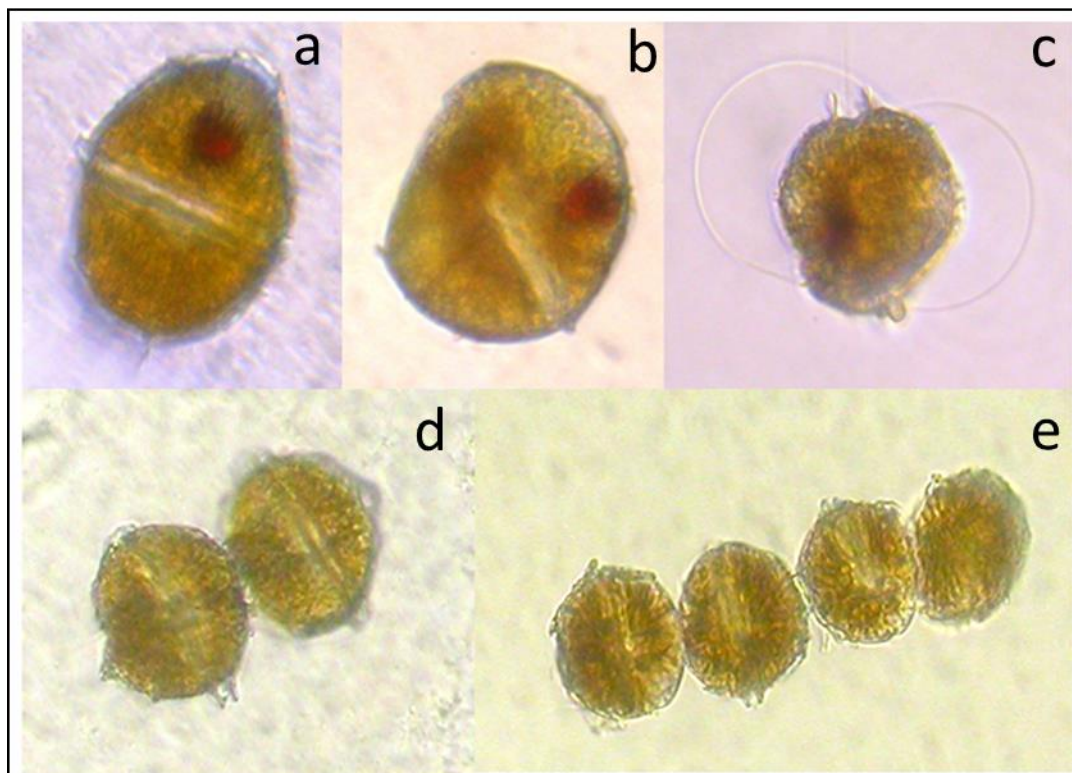


Figura 7. Células germinadas de *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* en cultivo: a) célula con pocas horas de haber germinado vista dorsal; b) vista lateral; c) célula en proceso de división, d) cadenas de 2 células después de 2 días de germinación del quiste; e) cadenas de 4 células una semana después de la germinación.

Crecimiento de *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*

La tasa de crecimiento de *P. bahamense* var. *compressum*, no presentó una fase Lag, durante los 5 primeros días se observó un crecimiento exponencial ($1\ 152 \pm 168.88$ células/L), del día 5 al 11 se registró una fase estacionaria con una concentración mínima de 900 ± 107.46 células/mL y después del día 11 se observó nuevamente un aumento en el crecimiento ($1\ 045 \pm 233.35$ células/mL) (Fig. 8). Su tasa de crecimiento fue de 0.45 divisiones/día. Durante la fase exponencial se observaron cadenas de 2 y 4 células, y durante la fase estacionaria cadenas de 2 células y solitarias.

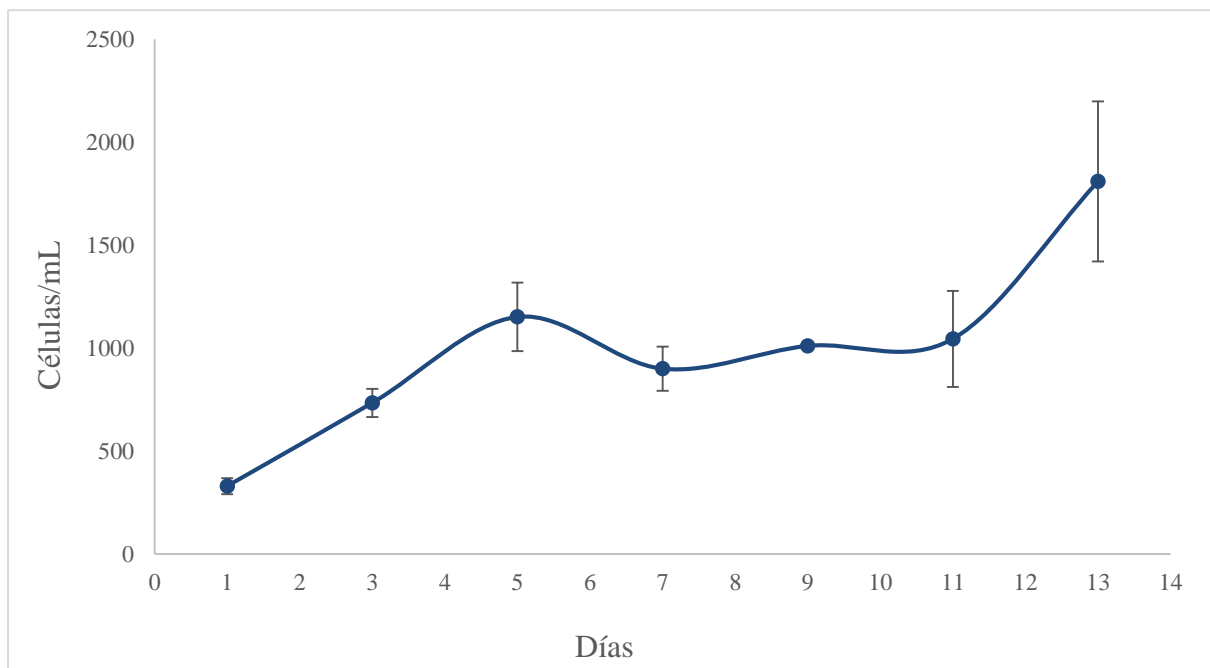


Figura 8. Curva de crecimiento de *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*.

Además de la especie descrita anteriormente, durante la realización del presente estudio se observaron otros quistes, sin embargo, como no germinaron o murieron poco después de la germinación, no fue posible confirmar su identidad taxonómica, solamente a nivel de género con las características morfológicas y biometría de los mismos.

3.4.2 *Gyrodinium* sp.

Quiste con forma ovoidal, cuyas dimensiones oscilaron entre los 51 a 69 μm (promedio $60.15 \pm 5.46 \mu\text{m}$) de largo y los 36 a los 66 μm (promedio $45.37 \pm 7.88 \mu\text{m}$) de ancho, en el perifragma fue posible apreciar el parasulcus y el paracingulum (Fig. 9a). La pared del quiste es incolora, carece de proyecciones y está conformada por dos capas lisas. La coloración del citoplasma varió entre tonos amarillo pálido a verdoso, el interior se pudo observar una mancha de color pardo de tamaño variable de 8 a 25 μm (promedio $19.1 \pm 4.59 \mu\text{m}$) (Fig. 9b). Cuando el quiste se encuentra en estado deteriorado es posible apreciar la formación de gránulos de lípidos, así como, de la deformación del cuerpo pardo (Fig. 9c). La identificación se realizó utilizando como referencia el trabajo de Kojima y Kobayashi (1992), la guía de identificación de Matzuoka y Fukuyo (2000) y la comparación de quistes de *Gyrodinium* sp. de un cultivo del LFM.

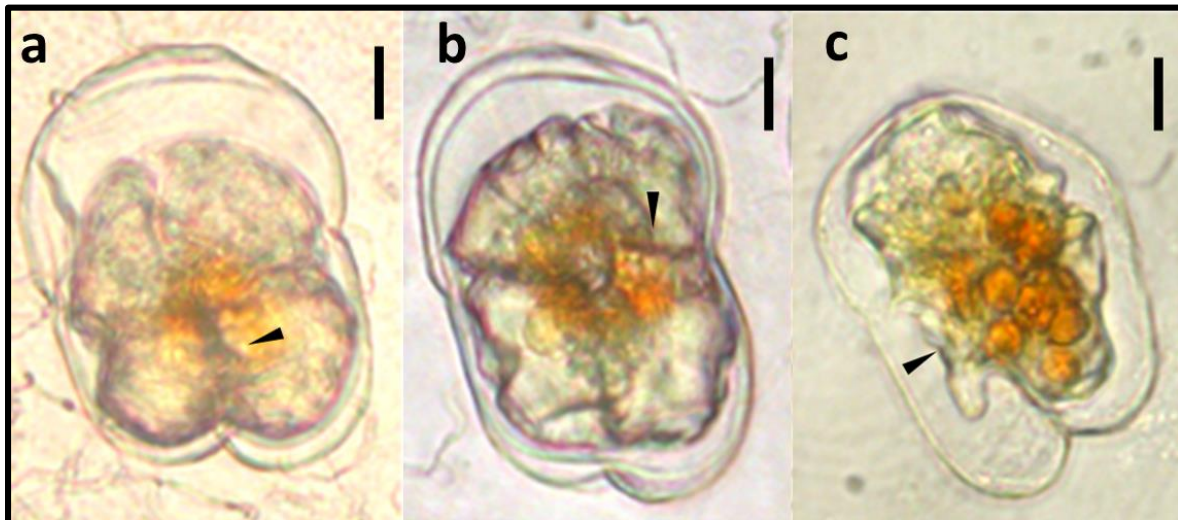


Figura 9. Quiste de *Gyrodinium* sp. a) quiste viable con planocigoto casi formado, se destaca el parasulcus; b) paracingulum y cuerpo pardo definido; c) quiste deteriorado con el interior degradado. Barra de escala = 10 μ m.

3.4.3 *Alexandrium* sp.

Quiste esférico, cuyo diámetro varió entre 45 a 69 μ m, promedio 54.23 \pm 5.9 μ m. La pared del quiste incolora y conformada por dos capas lisas, sin proyecciones. Sin embargo, se observó la presencia de una sustancia probablemente mucílago que forma una capa uniforme que cubría completamente el quiste y cuyo grosor osciló entre 0.82 a 56 μ m (promedio 23.71 \pm 10.62 μ m) a partir de la capa externa de la pared celular (Fig. 10a).

El citoplasma granular con coloraciones amarillo verdosas, además en ocasiones se observó gránulos de lípidos completamente transparentes. Aunque, no se observó la formación de un cuerpo rojo definido, si se determinó en algunos casos la presencia de una mancha de color amarillo fuerte o casi naranja que medía entre 10 a 28 μ m de diámetro (promedio 19.33 \pm 4.21 μ m) (Fig. 10a, 10b y 10d). Para la identificación se utilizaron descripciones realizadas por Matsuoka y Fukuyo (2000), Bravo *et al.* (2007), Van Hauwaert (2016).

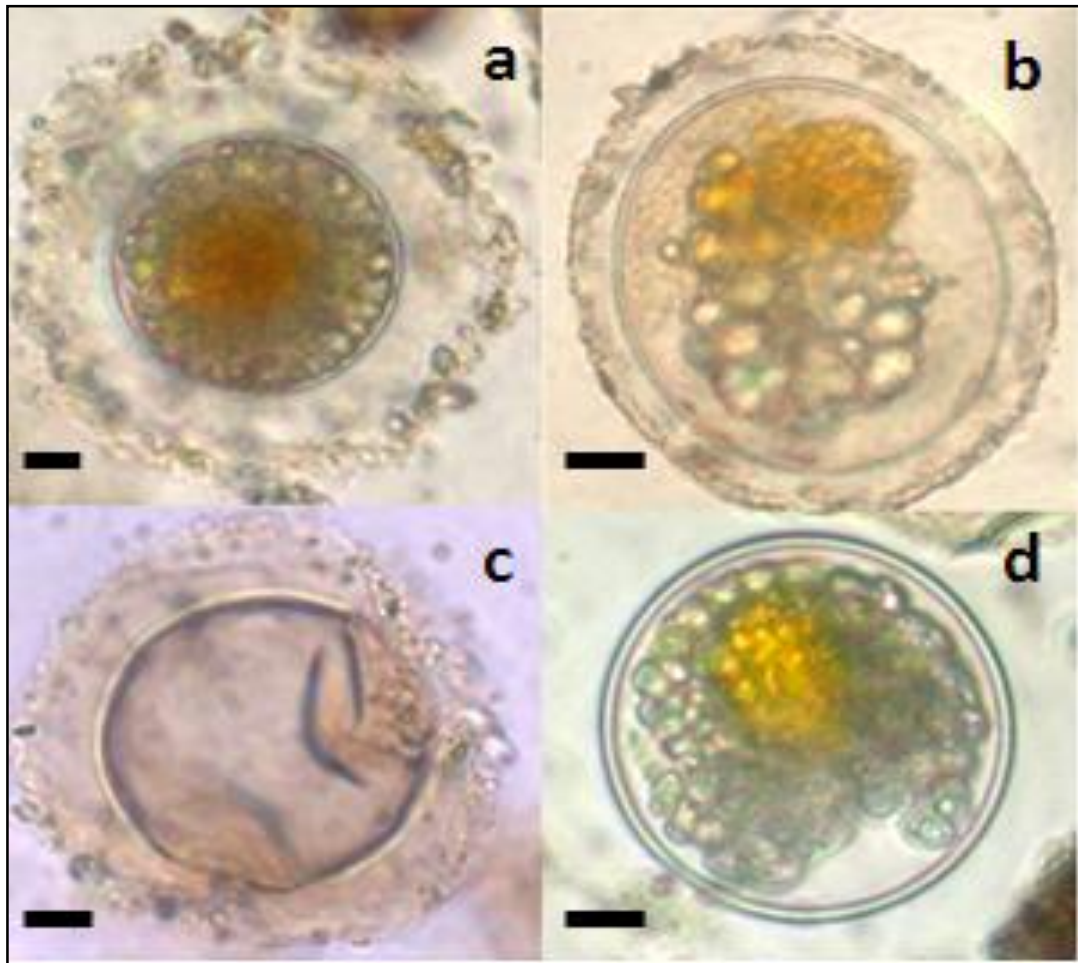


Figura 10. Quiste de *Alexandrium* sp. a) quiste viable, con cuerpo naranja y citoplasma verdoso, cubiertos por una capa gruesa de mucílago; b) quiste deteriorado con el citoplasma con gránulos; c) quiste vacío; d) quiste sin capa de mucilago, con interior deteriorado. Barra de escala= 10 μ m.

3.4.4 Quiste Tipo I

Quistes de forma esférica cuyo diámetro total incluyendo las proyecciones osciló entre los 68 μm hasta los 107 μm , con un promedio de $97\pm 10.07\mu\text{m}$. La pared del quiste completamente incolora y cubierta por numerosas proyecciones del tipo acuminado, las cuales se caracterizaron por ser sumamente delgadas, rectas con terminación en punta y una leve bifurcación en la base. Estas prolongaciones tuvieron una longitud entre los 5 μm a 12 μm , con un promedio de $8.45\pm 1.81\mu\text{m}$ (Fig. 11a). El contenido celular de color rojo ferroso intenso en un quiste viable (Fig. 11b). En los quistes deteriorados se observó la pérdida de coloración, contenido celular y la formación de gránulos de lípidos (Fig. 11c y 11d). El arqueopilo es del tipo transapical (Fig. 11e y 11f). En este caso no se encontró similitudes con descripciones en la literatura, por eso se mantiene como quiste Tipo 1.

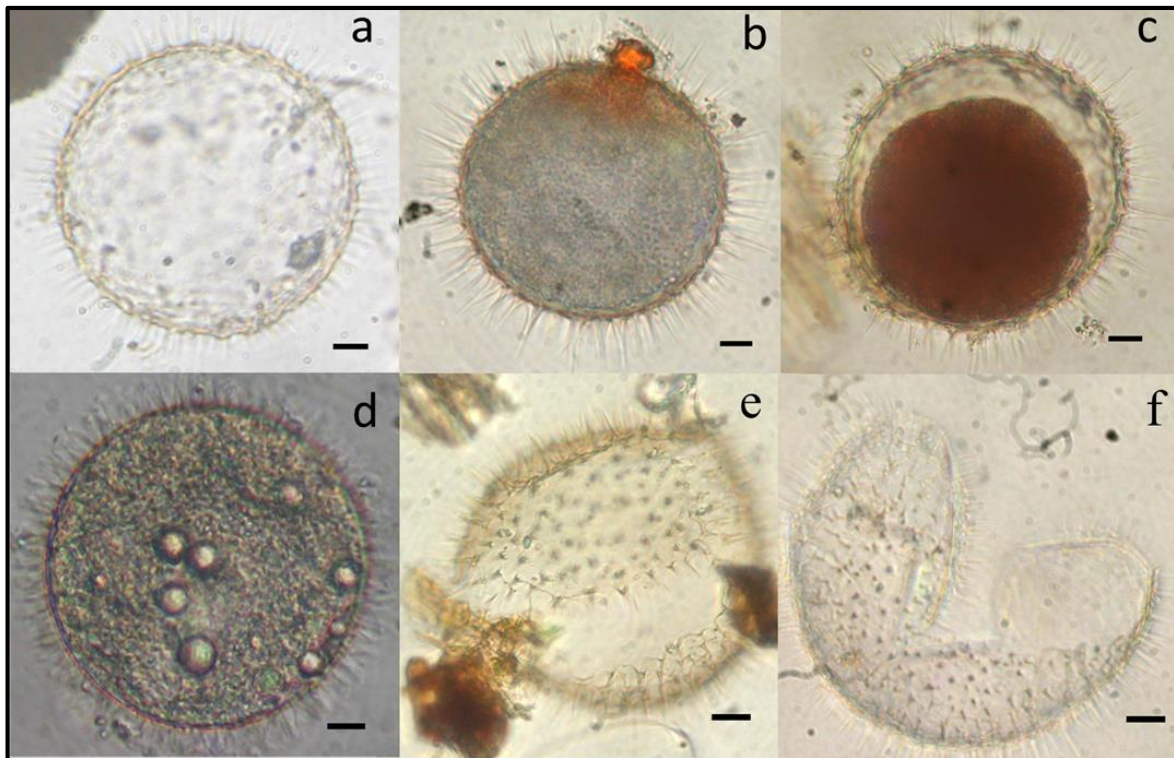


Figura 11. Quiste Tipo I: a) Quiste vacío con forma esférica cubierto con proyecciones del tipo acuminado, con la pared completamente transparente en ausencia de contenido celular, b) quiste viable, con contenido celular color rojizo, c) quiste en proceso de degradación, expulsión de contenido celular luego de ser colocado en la cámara de incubación; d) formación de gránulos de lípidos en un quiste deteriorado, se observa un con espacio amplio entre el citoplasma y la pared celular; e y f) detalle del arqueópilo. Barra escala= 10 μm .

3.4.5 *Gonyaulax sp.*

Quieste de forma semiesférica, cuyo diámetro total fue de 98 μm , con ornamentaciones que se conectan entre sí desde sus puntos distales a través de trabéculas (Fig. 12a), la base de las ornamentaciones bifurcada (Fig. 12b), la pared celular transparente, los quistes encontrados no presentaba contenido celular (Fig. 12c) y no fue posible identificar el tipo de arqueopilo. Para la identificación se utilizaron descripciones realizadas por Matsuoka y Fukuyo (2000), Van Hauwaert (2016).

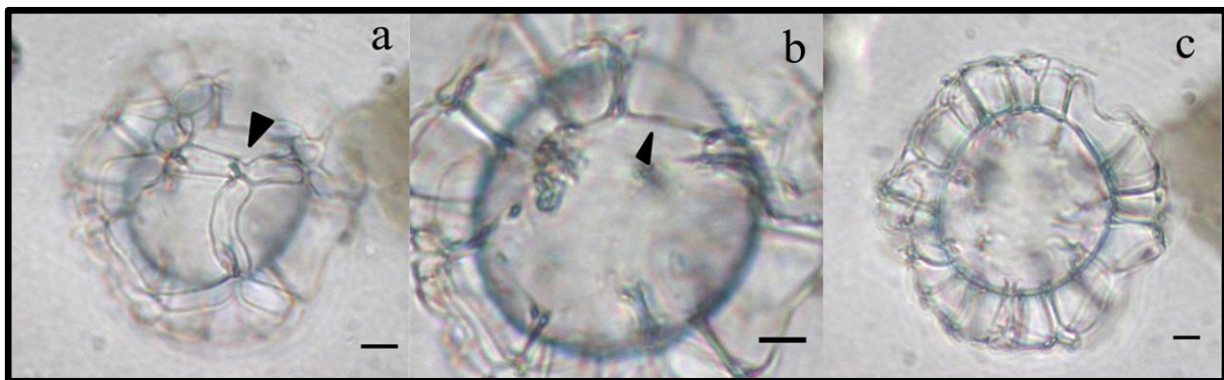


Figura 12. a) Detalle de las trabéculas que conectan los puntos distales de las proyecciones del quiste, b) detalle de las bases de las proyecciones donde se evidencia la bifurcación, c) quiste sin contenido celular, pared celular translúcida. Barra escala = 10 μm .

3.4.6 *Protoperidinium sp.*

3.4.6.1 *Protoperidinium sp.* Tipo 1.

El cuerpo del quiste es de forma pentagonal robusta, con un ancho de 56 a 60 μm , mientras que de alto 74 a 79 μm . la pared de color pardo translúcido, en el interior del quiste se observaron gránulos (Fig. 13). Para la identificación se utilizaron descripciones realizadas por Matsuoka y Fukuyo (2000), Dale (2001), Van Hauwaert (2016).

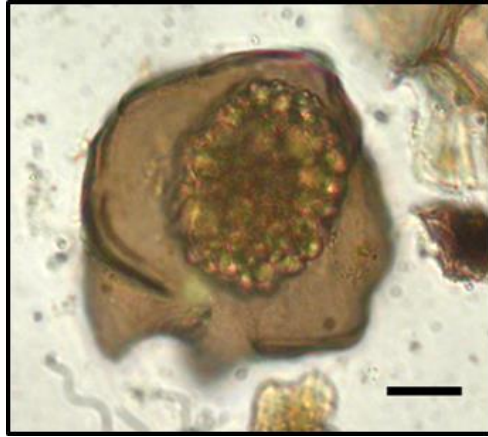


Figura 13. Quiste de *Protoperidinium sp. Tipo 1*. Barra escala= 10 μ m.

3.4.5.2 *Protoperidinium cf. stellatum*

Cuerpo del quiste en forma pentagonal y siempre comprimido dorso-ventralmente. Cinco proyecciones en forma de cuernos terminadas en punta en la parte distal. En este caso no se encontraron quistes con contenido celular aparentemente viable, únicamente con el citoplasma reducido (Fig. 14). Para la identificación se utilizaron descripciones realizadas por Matsuoka y Fukuyo (2000), Van Hauwaert (2016), Head *et al.* (2019).

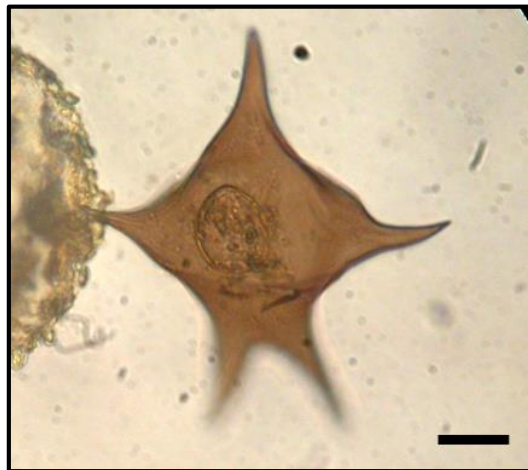


Figura 14. Quiste de *Protoperidinium sp. cf. stellatum*. Barra de escala = 10 μ m

3.4.6 *Gymnodinium cf. catenatum*

Quiste de forma esférica, pared microreticulada de coloración rojiza parda, sin ornamentaciones, el arqueopilo es tipo cryptofilico cásmico (Fig.15 a y b). Únicamente se encontraron quistes vacíos. La identificación se realizó basado en las descripciones de Anderson *et al.* (1988), Matsuoka y Fukuyo (2000), Figueroa *et al.* (2006).

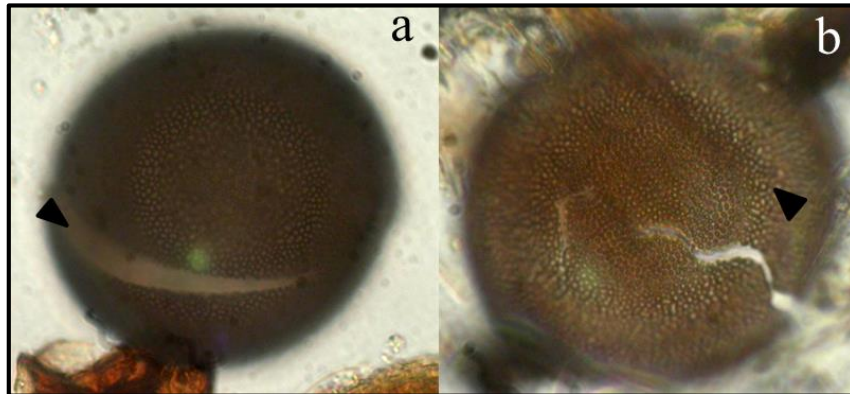


Figura 15. Quiste de *Gymnodinium cf. catenatum*. a) arqueopilo b) microreticulaciones

3.4.7 *Pheopolykrikos sp.*

Debido a la longitud de sus ornamentaciones robustas este quiste se clasificó como proximocorado, ya que, cada una de estas proyecciones alcanzó el 30% del diámetro total del cuerpo del quiste. Su forma es alargada con los bordes también redondeados, los procesos son del tipo vallate, ya que, son robustos y en el extremo distal poseen ramificaciones (Fig. 16). Para la identificación se utilizaron descripciones realizadas por Matsuoka y Fukuyo (2000).



Figura 16. Quiste de *Pheopolykrikos sp.* (Se indica las ramificaciones en las ornamentaciones).
Barra de escala= 10 μ m

3.5. Distribución de los quistes de resistencia en el Golfo de Nicoya.

3.5.1 Concentración total de quistes

De acuerdo con los patrones de distribución y concentración de quistes totales (Fig. 17a), los puntos de muestreo ubicados en las zonas externas del Golfo de Nicoya son los que presentaron la mayor concentración de quistes, siendo la estación de muestreo Tárcoles la que presentó la concentración más alta registrada (75 ± 52.9 quistes/mL). En la zona interna del Golfo, las áreas cercanas a la desembocadura del río Tempisque se registraron las concentraciones más bajas, siendo Puerto Palito la estación de muestreo con un promedio de 1 ± 0.81 quiste/mL. Es importante destacar que en el área ubicada entre las islas Caballo y San Lucas se observó un aumento en la concentración (49 ± 28.38 quistes/mL).

La concentración más alta de quistes viables se registró en la estación de muestreo Tárcoles con un valor de 63 ± 26.2 quistes/mL. En el caso del área comprendida desde Isla Caballo hasta Isla Chira la concentración de quistes viables es baja, incluso en algunas de las muestras analizadas no se observaron quistes (Fig. 17b).

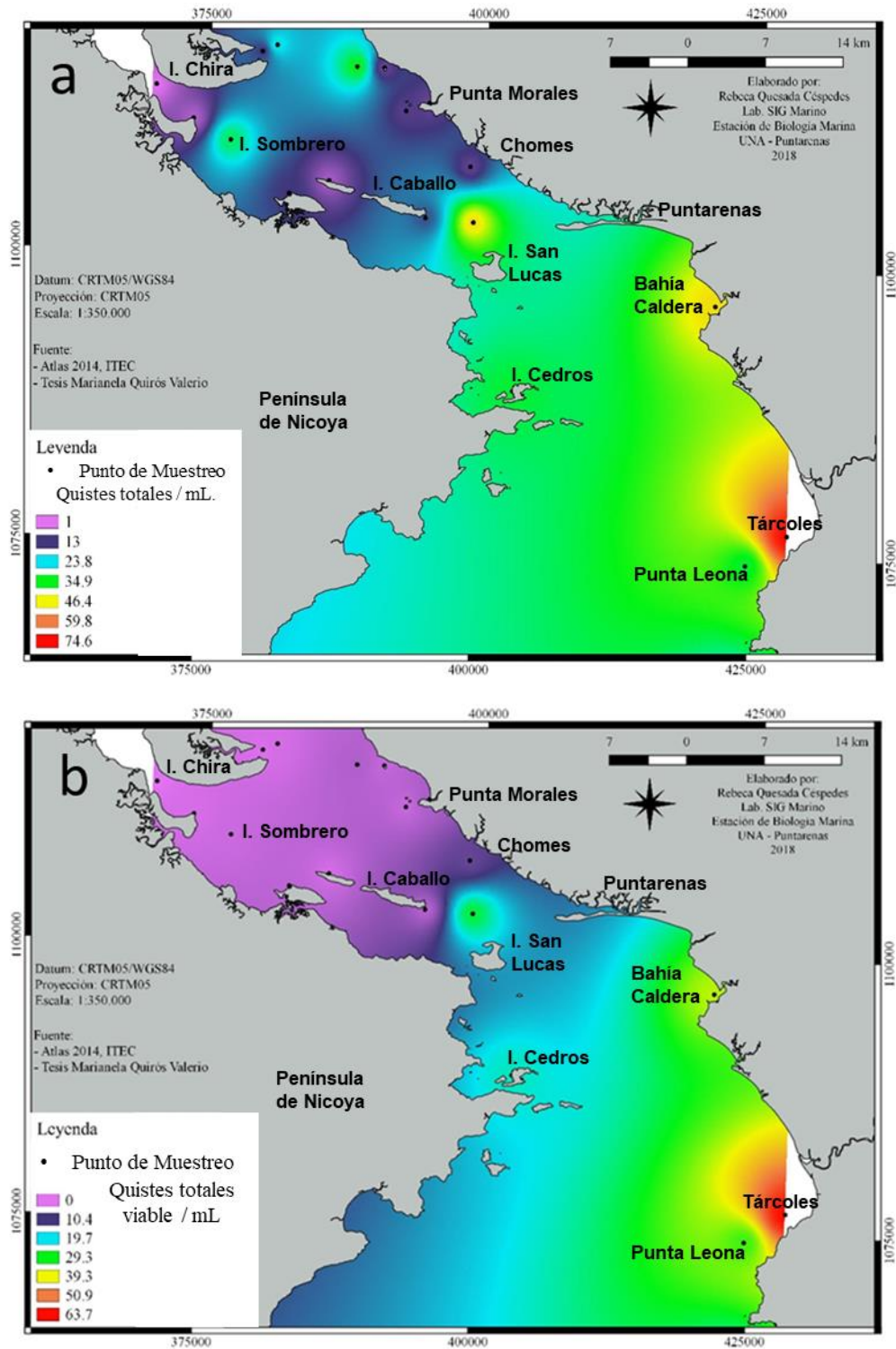


Figura 17. Distribución espacial de los quistes aislados de los sedimentos: a) Distribución de los quistes de resistencia totales de dinoflagelados; b) Distribución de los quistes de resistencia viables, durante el periodo abril 2013 a abril 2014, Golfo de Nicoya, Puntarenas Costa Rica.

3.5.2. Distribución de quistes de resistencia de *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*

La concentración de los quistes de resistencia de *P. bahamense* var. *compressum* en la estación de muestreo Tárcoles fue en promedio de 31 ± 15.44 quistes/mL, área en la que se registró también la concentración mayor de quistes totales. En general, esta especie se encontró con mayor concentración en los sedimentos ubicados en las zonas más externas del Golfo, mientras que conforme se aproximaba a la parte interna la concentración de éstos disminuía (Fig. 18).

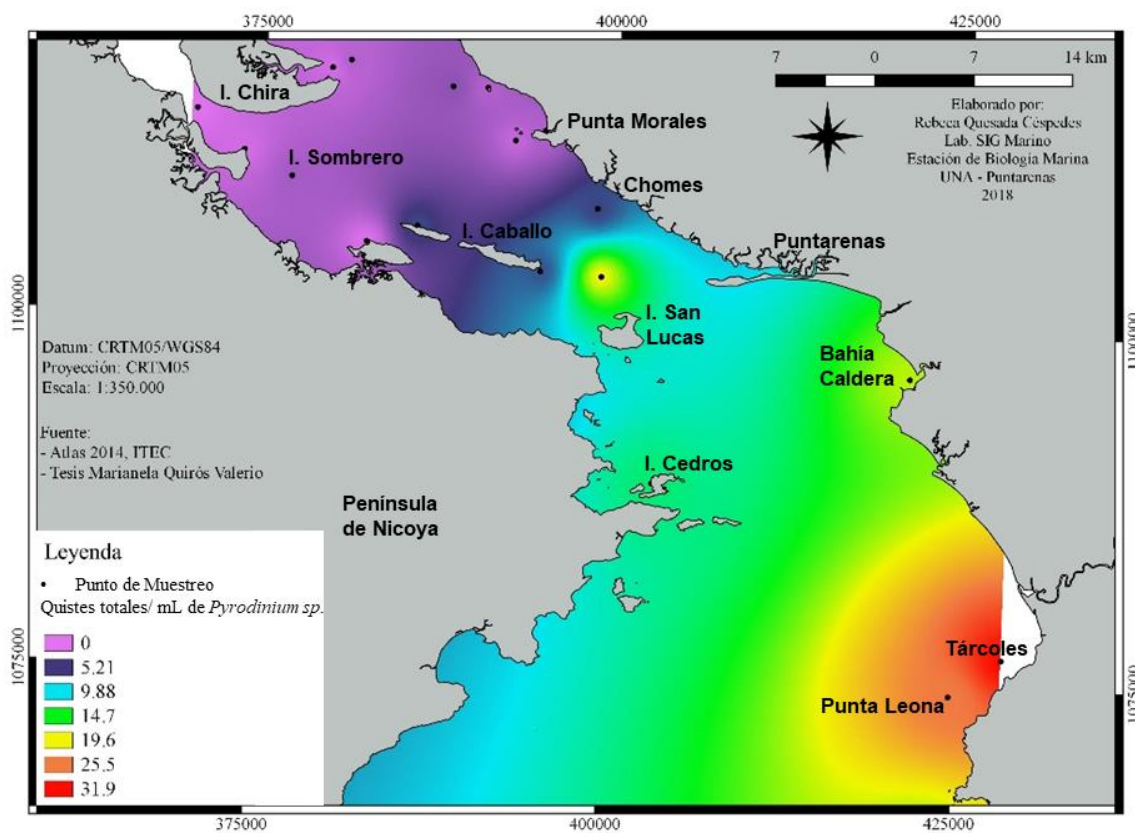


Figura 18. Distribución espacial de la concentración total de quistes de resistencia de *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* durante el periodo abril 2013 a abril 2014. Golfo de Nicoya. Puntarenas Costa Rica.

La zona de Tárcoles se destacó como un punto importante de acumulación quistes viables de *P. bahamense* var. *compressum*, con una concentración promedio de 30 ± 15.10 quistes/mL la más alta registrada, seguida por las estaciones de muestreo de Punta Leona con 25 ± 14.01 quistes/mL. Importante indicar que el punto entre las islas de Caballo y San Lucas presentaron una concentración similar a la zona de Bahía Caldera con un promedio de

17±13.3 quistes/mL. Por otro lado, nuevamente la zona interna del Golfo se caracterizó por la ausencia de quistes, la mayor parte de esta zona el valor promedio de quistes viables encontrados fue cercano a 0±0 (Fig. 19).

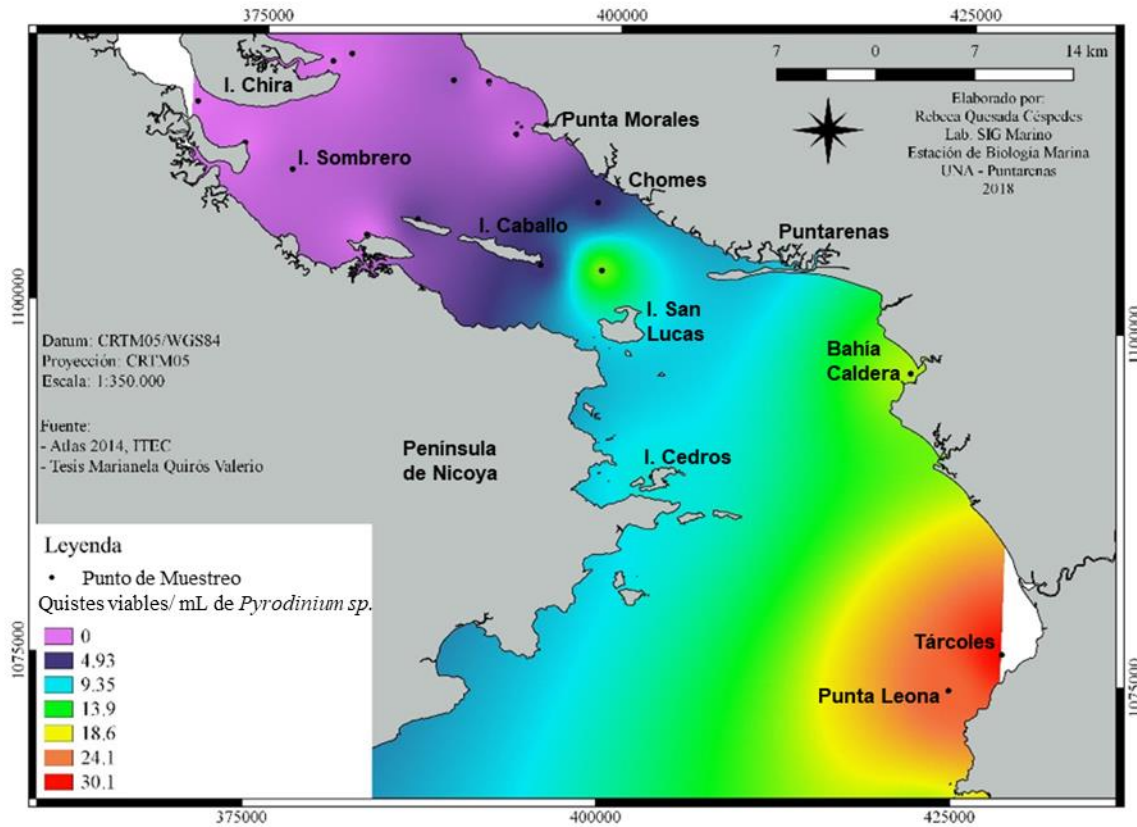


Figura 19. Distribución espacial de la concentración de quistes de resistencia viables de *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* durante el periodo abril 2013 a abril 2014, Golfo de Nicoya, Puntarenas Costa Rica.

3.5.3. Distribución de quistes de resistencia de *Gyrodinium* sp.

La concentración de los quistes totales de *Gyrodinium* sp., fue sumamente baja a lo largo de todo el golfo, incluso el punto con la mayor concentración de quistes totales ubicado entre las islas Caballo y San Lucas únicamente alcanzó un valor promedio de 0.88 ± 0.99 quistes/mL (Fig. 20).

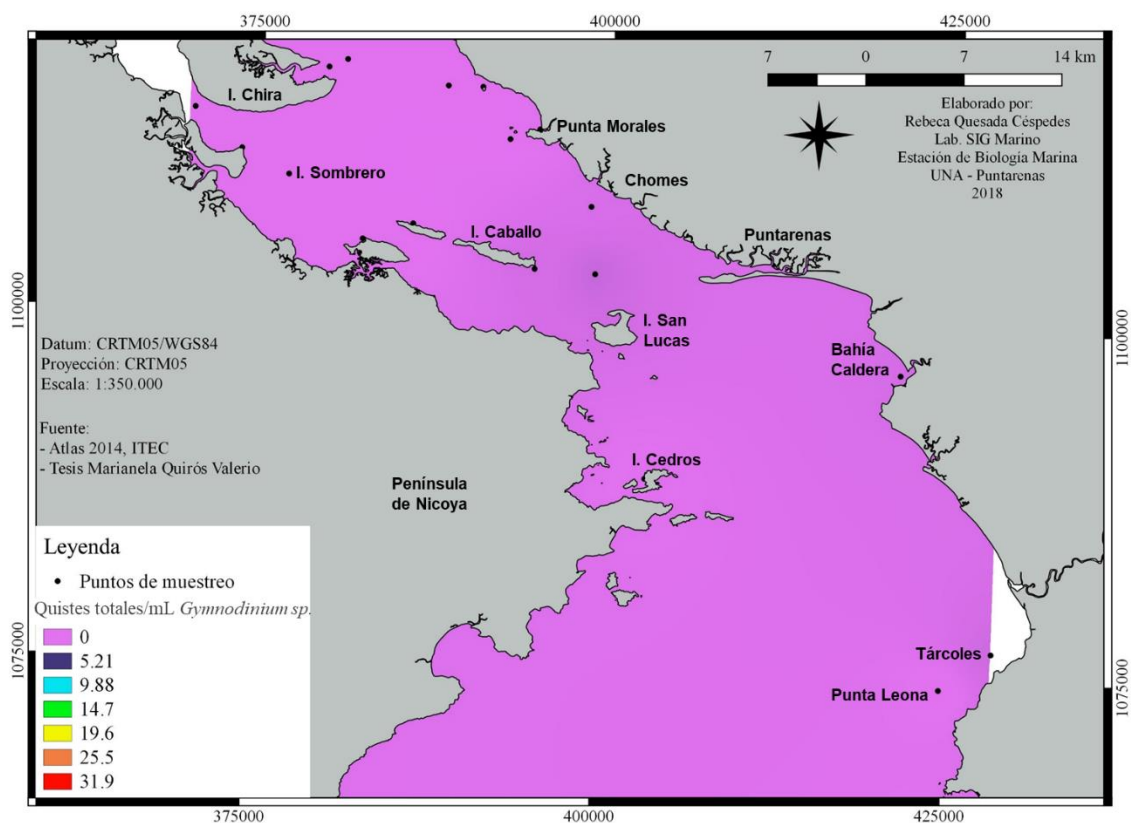


Figura 20. Distribución espacial de la concentración de los quistes totales de *Gyrodinium* sp. durante el periodo abril 2013 a abril 2014, Golfo de Nicoya, Puntarenas, Costa Rica.

La concentración mayor de quistes viables de *Gyrodinium* sp. se ubicó en las áreas cercanas a las islas Caballo y San Lucas, con un valor promedio de 0.88 ± 0.99 quistes/mL. Las estaciones de muestreo ubicadas en la zona más interna del Golfo fueron donde se determinaron los valores más bajos (Fig. 21).

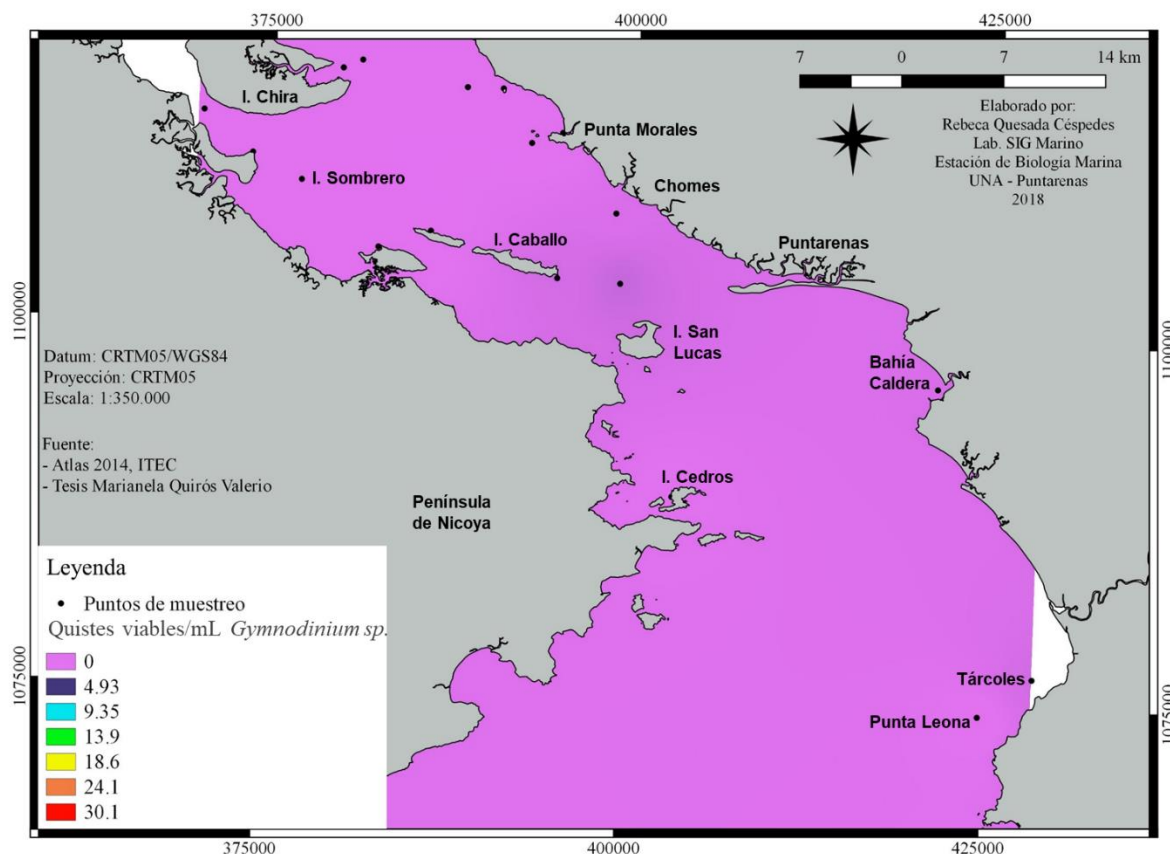


Figura 21. Distribución espacial de la concentración de los quistes viables de *Gyrodinium* sp. durante el periodo abril 2013 a abril 2014, Golfo de Nicoya, Puntarenas, Costa Rica.

3.5.4 Distribución de quistes de resistencia de *Alexandrium* sp.

Los quistes de *Alexandrium* sp. se encontraron en mayores concentraciones cerca de las zonas de Paquera e Isla Cedros, así como, en la bahía de Caldera, para estos puntos las concentraciones promedio de quistes totales fue de 3.88 ± 4.22 quistes/mL. Mientras que en la zona interna del golfo no se registraron quistes a excepción de Chomes y Costa de Pájaros donde se alcanzó una concentración promedio de 1.2 ± 0.88 quistes/mL (Fig. 22). En cuanto a los quistes viables, al igual que con los quistes totales las mayores concentraciones se observaron en las estaciones de muestro ubicadas en la parte externa del golfo, donde se alcanzaron concentraciones de 3.27 ± 3.18 quistes/mL (Fig. 23).

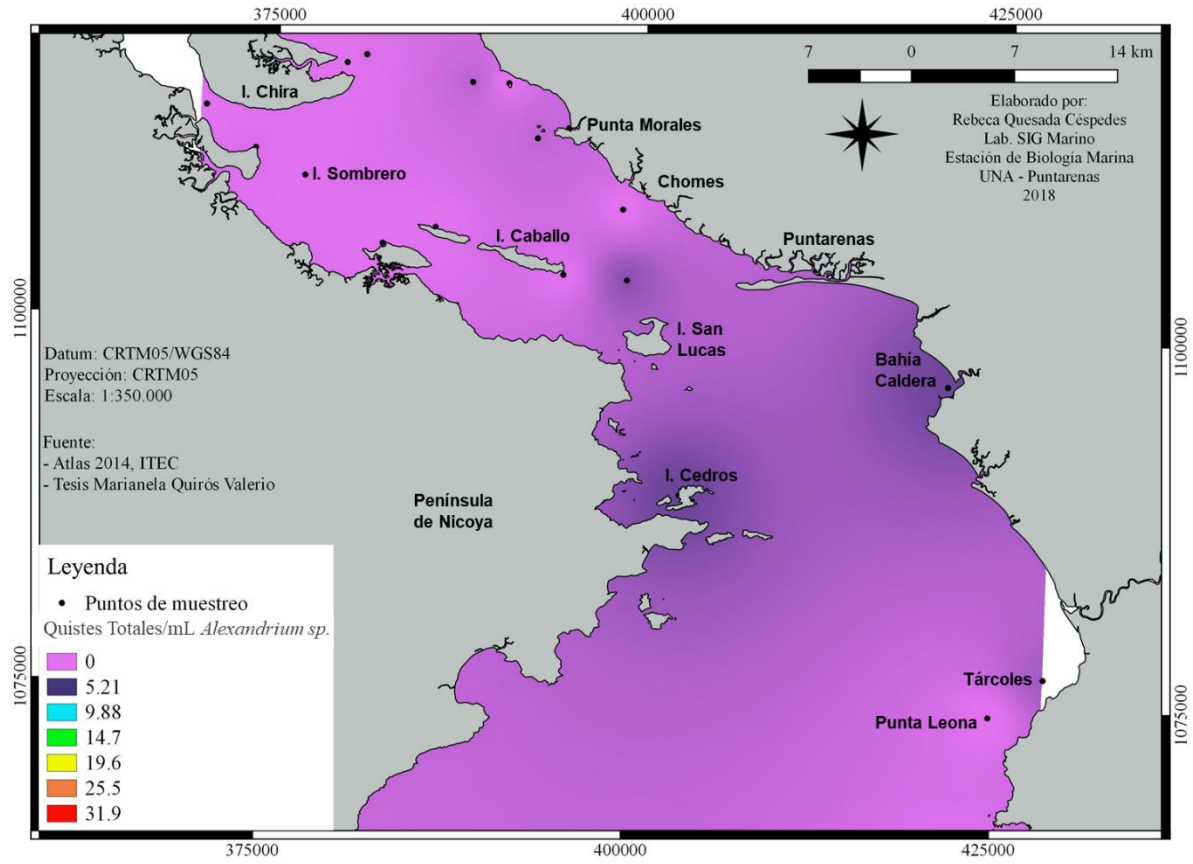


Figura 22. Distribución espacial de la concentración de los quistes totales de *Alexandrium sp.* durante el periodo abril 2013 a abril 2014, Golfo de Nicoya, Puntarenas, Costa Rica.

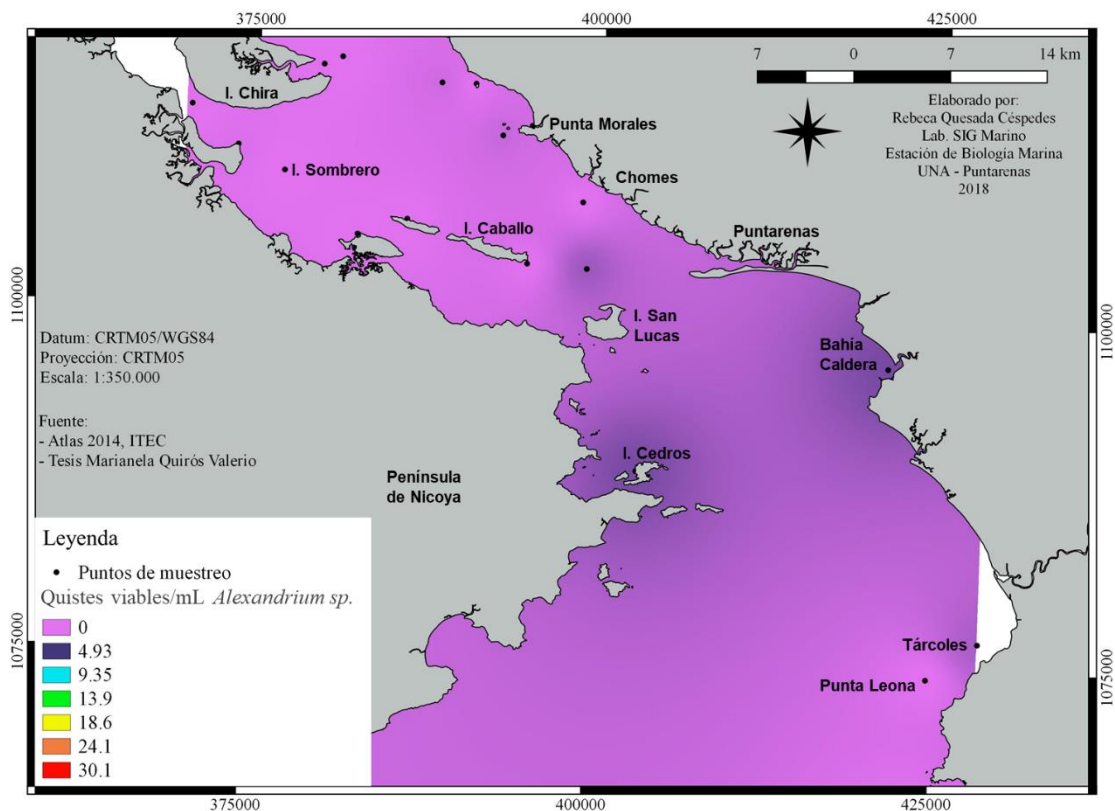


Figura 23. Distribución espacial de la concentración de los quistes viables de *Alexandrium sp.* durante el periodo de abril 2013 a abril 2014, Golfo de Nicoya, Puntarenas, Costa Rica.

3.5.6 Distribución de quistes de resistencia de quiste Tipo I.

Los valores de quistes de resistencia totales de quiste Tipo I, se registraron en mayor cantidad en la zona interna del golfo, contrario a lo reportado con las especies mencionadas anteriormente. Precisamente, en los puntos cercanos a Isla Pajarita (30.8 ± 10.5 quistes/mL), la Bocana de Isla Chira (28 ± 6.3 quistes/mL) y en Isla Sombrero (29 ± 14.38 quistes/mL) se registraron los promedios de quistes totales/mL. Mientras que en la zona externa del Golfo la concentración más alta fue de 11 ± 8.9 quistes/mL en Bahía Caldera (Fig. 24).

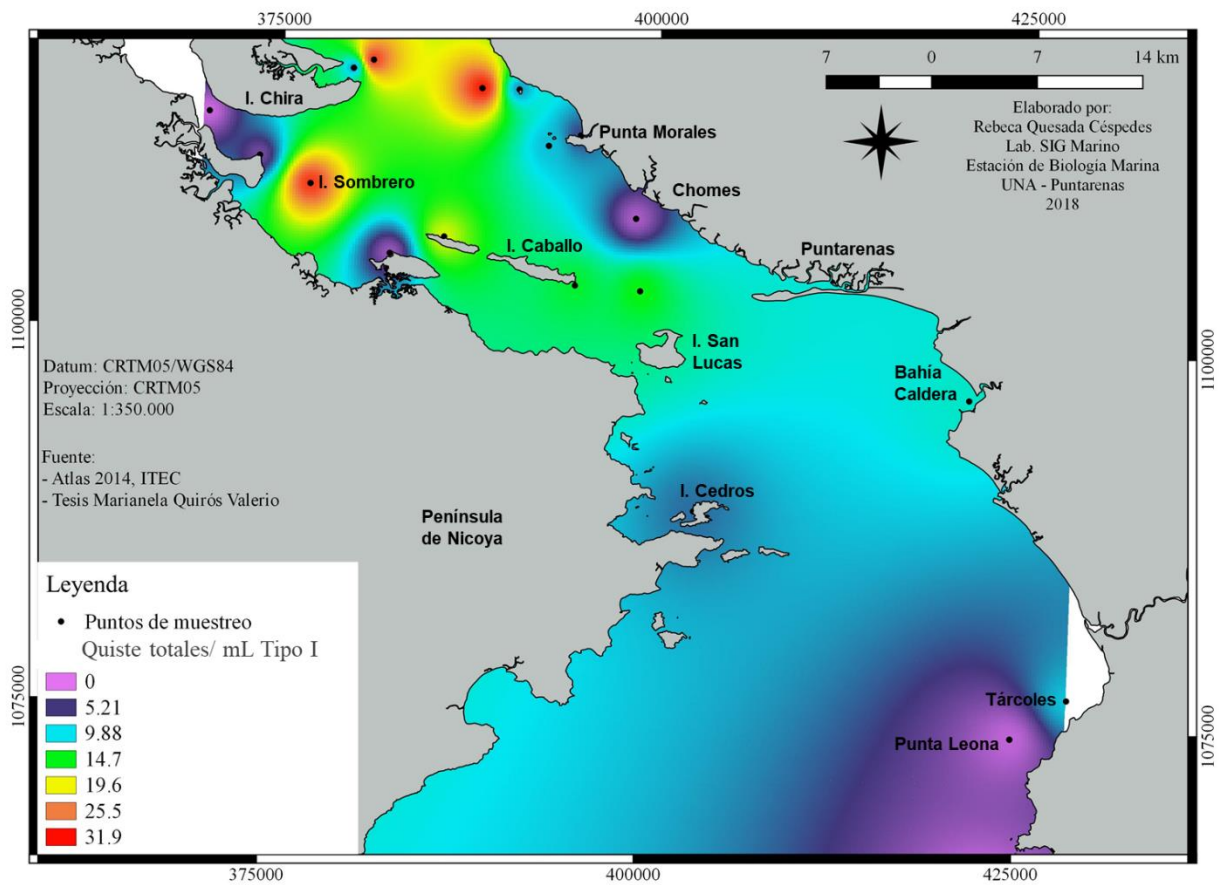


Figura 24. Distribución espacial de la concentración de los quistes totales de Quiste Tipo I durante el periodo abril 2013 a abril 2014, Golfo de Nicoya, Puntarenas, Costa Rica.

La concentración más alta de los quistes de resistencia viables de quiste Tipo I, se determinó en la zona de Bahía Caldera, con un valor promedio de 2.47 ± 2.8 quistes/mL, en las estaciones de muestreo ubicadas cerca de la Isla de Chira, Chomes y Punta Leona presentaron la concentración más baja donde la concentración de quistes/mL fue de 0 ± 00 (Fig. 25).

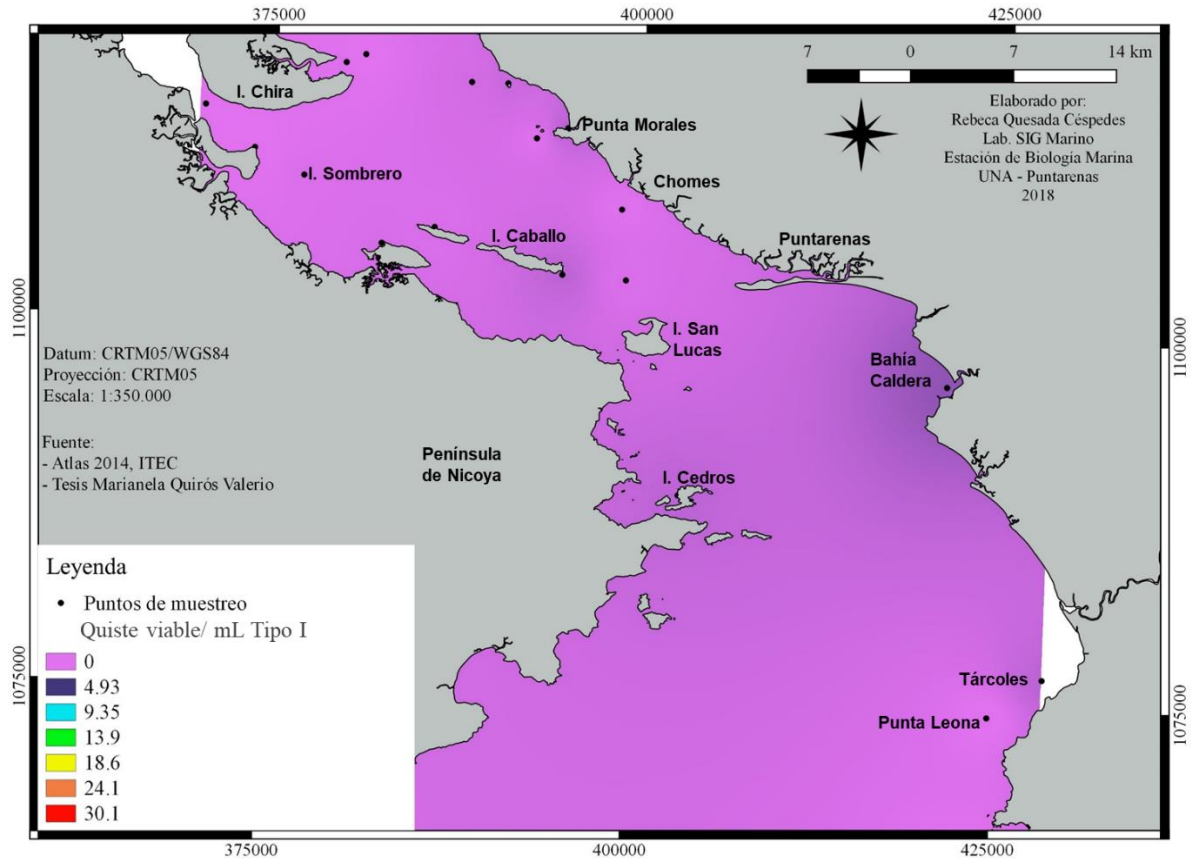


Figura 25. Distribución espacial de la concentración de los quistes viables de Quiste Tipo I durante el periodo abril 2013 a abril 2014, Golfo de Nicoya, Puntarenas, Costa Rica.

Al comparar las concentraciones, los quistes de *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* y Tipo I son los que más presencia tuvieron a lo largo del golfo, y además presentaron una clara concentración en zonas específicas a diferencia de lo que ocurrió con los quistes de *Alexandrium sp.* y *Gyrodinium sp.* Sin embargo, al realizar una comparación únicamente de los puntos donde se acumulan quistes viables, es *P. bahamense* var. *compressum* que mantuvo una concentración alta y se observó una tendencia claramente definida de las zonas de acumulación a diferencia de las otras especies.

4. Discusión.

4.1 Características de las estaciones de muestreo.

En las estaciones de muestro ubicadas cerca de Tárcoles, Bahía Caldera, Isla Cedros, Punta Leona, Herradura y San Lucas predominaron las salinidades altas de carácter oceánico, las temperaturas se mantuvieron más bajas que en la zona interna y en su mayoría el sedimento era arenoso fino, mientras que en las estaciones ubicadas en la zona interna del Golfo los sedimentos son muy finos (León-Coto *et al.* 1998, Vega y Quesada 2013), la temperatura del agua es constante y la salinidad es más baja producto de los aportes del Río Tempisque (Ballestero *et al.* 2018). De acuerdo con Van Hauwaert (2016), Lin *et al.* (2019) y Bronahan *et al.* (2020) la conjugación de estos tres factores influye directamente en la distribución de los quistes resistencia. Figueroa *et al.* (2018), señalaron la importancia de la temperatura, salinidad, luz, disponibilidad de nutrientes como factores que modulan la germinación de los quistes de resistencia. Heikkila *et al.* (2014) consideraron que la disponibilidad de luz, nutrientes y estratificación controlada del agua dulce influyen en la distribución espacial y producción de los quistes de resistencia de los dinoflagelados.

Lewis *et al.* (2018), enfatizan que las variaciones de las corrientes de acuerdo a la estacionalidad anual marcada por las épocas lluviosa y seca, así como, los sedimentos aportados por los ríos influyen en la producción de quistes de resistencia. Durante la estación lluviosa, el aporte de agua dulce producto de la creciente en los ríos Tempisque en la zona interna, Barranca y Grande de Tárcoles en la zona externa, producen una estratificación marcada horizontalmente, donde la variación en la salinidad fluye desde la parte norte del Golfo hacia el sur a lo largo de la costa este, mientras que las aguas suben hacia el interior a través de la costa oeste (Voorhis *et al.* 1983). Por otra parte, durante la estación seca se da una mezcla en la columna de agua producto de los fuertes vientos característicos del periodo comprendido entre diciembre y abril, únicamente en las áreas profundas de la zona más externa del Golfo, donde las profundidades pueden llegar hasta los 200 m, la mezcla no llega a alcanzar el fondo (Viquez y Hargraves 1995).

Estas condiciones del Golfo podrían favorecer la acumulación de quistes viables observadas en las estaciones de Tárcoles y Bahía Caldera principalmente, ya que fueron las áreas donde se registraron más quistes viables, convirtiendo estas zonas en potenciales

semilleros, a diferencia de lo ocurrido en el caso de las estaciones cercanas a las islas Berrugate y Pajarita, donde la disponibilidad de quistes viables fue muy baja. Además, es posible que los quistes de resistencia registrados en estas zonas internas hayan sido transportados por corrientes del Golfo desde otras áreas con mayor abundancia, tal y como ha sido señalado por Sarjeant *et al.* (1987) y Matsuoka y Fukuyo (2000) quienes concluyen que las corrientes marinas actúan como medios de dispersión geográfica para los quistes de resistencia, trasladándolos lejos de su lugar de origen.

Estudios realizados en las zonas templadas, indican concentraciones de hasta 5000 quistes por gramo de sedimento seco de acuerdo con lo reportado por Reidhaar *et al.* (2015), lo cual contrasta con los quistes contabilizados en este estudio, no obstante, en las zonas templadas es más factible que se dé la formación de quistes de resistencia como mecanismo para sobrellevar las condiciones adversas durante los meses de invierno cuando las condiciones de luz, temperatura y disponibilidad de nutrientes varían considerablemente (Van Hauwaert 2016). En un estuario tropical, estas condiciones suelen ser más constantes a lo largo del año, solo presentando pequeñas variaciones según sea la época lluviosa o seca. Además, las zonas tropicales contienen una gran diversidad de especies de dinoflagelados que no son formadores de quistes de resistencia (Baula *et al.* 2011), lo cual podría influir que las células permanezcan más tiempo en la columna de agua lo que provocaría una tasa de enquistamiento baja.

4.2 Identificación de los quistes de resistencia

De acuerdo con Van Hauwaert (2016), el tipo de arqueopilo, la cantidad, distribución y tipo de las ornamentaciones sobre la pared celular son las principales características a tener en cuenta para la identificación de los quistes de resistencia. Fukuyo y Matsuoka (2000) consideran, además de las características anteriores, que la forma del cuerpo y la coloración de la pared celular también son características con relevancia taxonómica.

No obstante, en ocasiones los quistes de resistencia no presentan estructuras distintivas fácilmente reconocibles o incluso podrían perderlas durante los procesos de sedimentación o depredación (Ichimi y Montani 2001), lo que aumenta la dificultad para identificar una especie solo por las características externas. Incluso puede ocurrir que los quistes de resistencia de algunos géneros sean muy similares entre sí, por lo que, para lograr una mayor certeza a la hora

de identificar el quiste de un dinoflagelado a nivel de especie es más confiable identificar la célula vegetativa producto de la germinación del quiste de resistencia (Gracia *et al.* 2013).

Pyrodinium bahamense var. compressum.

Esta especie fue descrita por primera vez por Plate en 1906, se asocia comúnmente con la producción de saxitoxina conocida como Intoxicación Paralítica por Moluscos (PSP “Paralytic Shellfish Poisoning”) (Reidhaar *et al.* 2015). Es una especie que llega a desarrollarse con mucha facilidad en ambientes con alta iluminación y aguas cálidas, requieren de un constante aporte de nutrientes, por lo que suelen ser más abundantes en áreas cercanas a manglares que brinden abundante materia orgánica (Morquecho *et al.* 2014). Sin embargo, se ha documentado que esta especie tiene la capacidad de reproducirse con éxito en ambientes con nitrógeno y fósforo reducidos, lo cual les brinda una ventaja competitiva sobre otras especies de dinoflagelados (Phlips *et al.* 2002).

Las características morfológicas y el tamaño de los quistes de resistencia de *Pyrodinium bahamense var. compressum*, como la longitud, forma y distribución de los procesos descritos en este trabajo concuerdan con la descripción realizada por Matsuoka y Fukuyo (2000), así como, las descripciones de otros trabajos como Hereid (2007), Martínez (2011) y Morquecho *et al.* (2014). En el caso del Morquecho *et al.* (2014), el diámetro sin ornamentaciones reportado para esta especie osciló entre los 43-56 μm mientras que en el presente trabajo los diámetros registrados llegaron hasta un máximo de 66 μm (promedio $55 \pm 3.89 \mu\text{m}$) es la única diferencia encontrada y puede ser explicada como un morfotipo del quiste cuyo tamaño podría ser más grande para las zonas tropicales a diferencia de las muestras estudiadas por Morquecho *et al.* (2014) que se ubican en zonas más al norte del continente americano como lo es el golfo de California.

Con respecto al registro de quistes cuyos procesos u ornamentaciones no estaban presentes, en un primer momento se consideró la posibilidad de que se trataran de quistes temporales o pellicles como los descritos por Bravo y Figueroa (2014) y que se asocia principalmente con las condiciones adversas, sin embargo, aún no se tiene claro cuáles son todos los factores que intervienen en la formación de este tipo de quiste y su proceso de germinación (Onda 2014). En este estudio, los quistes encontrados sin procesos aún se encontraban en estado de formación, considerando que otros aspectos como la formación del

cuerpo rojo, el arqueopilo y la coloración del contenido celular coincidieron con los descritos por Morquecho *et al.* (2014).

Mustakim *et al.* (2019), consideran que los estudios de *Pyrodinium* sp. han sido muy limitados por la dificultad de establecer los cultivos de esta especie en el laboratorio. Sin embargo, en este estudio el quiste de *P. bahamense var. compressum* mostró una mejor respuesta a las condiciones de cultivo, teniendo el porcentaje de germinación más alto. Además, las células vegetativas obtenidas a partir de los quistes germinados se adaptaron muy bien a las condiciones de laboratorio, lo que permitió que se establecieran los inóculos utilizados posteriormente para estimar la tasa de crecimiento.

La tasa de crecimiento de *P. bahamense var. compressum* fue de 0.45 divisiones/día, lo cual coincide con lo reportado por Geradia *et al.* (2007), quienes registraron una tasa de crecimiento para esta especie dentro de un rango de 0.2-0.4 divisiones/día. Los autores reportaron un crecimiento exponencial a los siete días después de realizado el inóculo en el medio de cultivo, a diferencia de los resultados que se obtuvieron en el presente estudio donde no se registró una fase de latencia, sino que la fase de crecimiento exponencial se presentó desde el día uno al día cinco después de realizado el inóculo. Morquecho *et al.* (2014), documentaron que el crecimiento óptimo del *P. bahamense var. compressum* en laboratorio se dio entre los 25°C a 30 °C y a una salinidad entre los 20 y 35 UPS. Omura y Fukuyo (2002) determinaron una tasa de crecimiento máxima de 0.38 divisiones/día a una temperatura de 28°C y una salinidad entre los 20 y 50 UPS. Al analizar los resultados del presente estudio con los obtenidos por otros investigadores, se evidencia que el crecimiento óptimo para esta especie se da en condiciones de temperatura y salinidad altas, ya que, las temperaturas bajas pueden inhibir las síntesis de proteínas que intervienen en el crecimiento celular (Geradia *et al.* 2007, Mustakim *et al.* (2019).

Gyrodinium sp.

A pesar de no ser identificado a nivel de especie, debido a que fueron muy pocos los quistes viables aislados de los sedimentos, si fue posible hacer la identificación a nivel de género. Algunos quistes de Gymnodiniales son conocidos por presentar una forma similar a la célula vegetativa, por mucho tiempo se tuvo el debate sobre si los fósiles encontrados de estas especies correspondían a células de resistencia (Kobayashi *et al.* 2001). Kajima y Kobayashi (1992) mediante el aislamiento y germinación de quistes extraídos de los sedimentos del lago Hamana, estudiaron la morfología de los quistes de *Gyrodinium instriatum*, las descripciones de los autores concuerdan con las características encontradas en los quistes aislados de *Gyrodinium sp.* del presente estudio, entre las que se destacan el ángulo marcado (aproximadamente de 90°) entre el paracingulum y el parasulcus, además de que el quiste se observó comúnmente cubierto de una capa de mucílago.

Gyrodinium sp. está considerado como una especie potencialmente nociva, puede causar altas mortalidades en granjas de camarón cuando produce floraciones algales cerca (Jimenez 1993). Por lo que, es recomendable mantener un monitoreo de estas especies para recopilar información que permita prevenir sus efectos nocivos (Gárrate-Lizarraga *et al.* 2013).

Alexandrium sp.

En el caso de los quistes de *Alexandrium sp.* aislados de los sedimentos de Golfo de Nicoya, a pesar de contar con las mejores condiciones en las cámaras de cultivo para la germinación de las células vegetativas no se logró una germinación exitosa que permitiera identificar la especie. Sin embargo, la identificación a nivel morfológico se realizó utilizando el trabajo de Matsuoka y Fukuyo (2000). Las principales características utilizadas para la identificación fueron la forma del quiste y diámetro del quiste, así como, la formación del mucílago alrededor de la pared celular.

Diversos autores, consideran que en el caso del género *Alexandrium* existe lo que se denomina reloj endógeno que se encarga de regular los procesos de germinación independientemente de las condiciones ambientales externas (Anderson y Keafer 1987; Matrai *et al.* 2005, Figueroa *et al.* 2018) lo que explica porque no fue posible la germinación.

Se ha documentado que algunas especies de *Alexandrium* la interacción entre los factores internos y externos controlan la latencia. Fischer (2017), observó que la germinación de los quistes de *Alexandrium catenella*, está influenciada por un ciclo endógeno que restringe las floraciones de esta especie a solo un corto intervalo de tiempo entre la primavera y principios de verano. El autor enfatizó que estas “germinaciones programadas” son especialmente importantes cuando se trata de semilleros profundos en las zonas templadas, mientras que en las zonas tropicales o para semilleros de poca profundidad los ciclos de germinación pueden estar influenciados por otros factores como la temperatura.

Actualmente, se han identificado cerca de 30 especies que conforman este género y al menos un 50% produce sustancias tóxicas como las saxitoxinas, espirólidos y goniominas, y en el caso de que no sean productores de toxinas sí podrían generar efectos nocivos sobre otros organismos cuando producen floraciones algales (Anderson *et al.* 2012). De los tres tipos de toxinas, las saxitoxinas son las que podrían tener los mayores impactos, ya que, bloquean selectivamente los canales de sodio de los animales, produciendo parálisis. Estas toxinas son tan fuertes que pueden afectar a los seres humanos cuando son consumidas a través de carne de moluscos que se alimentaron de microalgas tóxicas. A mayor escala, las consecuencias de las floraciones recurrentes de estas especies pueden implicar deterioro del turismo, alteraciones de las cadenas tróficas, mortalidad de especies marinas y pérdidas económicas cuantiosas en los sistemas productivos como la maricultura.

Quiste tipo I.

Se encontraron muy pocos individuos con contenido celular, y una vez que se colocaron en los pocillos de cultivo ninguno sobrevivió. Una de las características más interesantes es el diámetro que osciló entre los 68 μ m hasta los 107 μ m, pues es uno de los más grandes registrados en este estudio, aunado a esto la falta de diferenciación en el contenido celular fueron factores que dificultaron más su identificación taxonómica.

Con respecto a los quistes de *Gonyaulax sp.*, *Gymnodinium cf. catenatum.*, *Protoperidinium sp tipo 1* y *Protoperidinium sp cf. stellatum*, *Pheopolykrikos sp.* en su mayoría se trataron de observaciones únicas, los quistes no presentaban contenido celular viable. En ninguno de los casos fue posible recopilar suficiente información que permitiera realizar una identificación a nivel de especie, a pesar de utilizar guías de identificación basadas solo en las

características morfológicas como el caso de Matsuoka y Fukuyo (2000) y publicaciones con descripciones detalladas. Sin embargo, todas estas especies corresponden a géneros que podrían generar floraciones algales nocivas.

4.3 Distribución de quistes de resistencia en el Golfo de Nicoya

De acuerdo al registro del Laboratorio de Fitoplancton Marino de la Estación de Biología Marina Juan Bertoglia Richards entre el 2002 y el 2013 se registraron 44 eventos de floraciones algales dentro del Golfo de Nicoya (Calvo-Vargas 2019, comunicación personal). Calvo-Vargas *et al.* (2016) concluyeron que el incremento en las concentraciones y la ampliación de las zonas de impacto de las floraciones algales registradas son indicativos que el Golfo de Nicoya ofrece condiciones favorables para la proliferación de estos organismos.

Las concentraciones más altas de quistes de *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*, se registraron en las zonas aledañas a Tárcoles y Bahía Caldera, por lo que, estas áreas podrían ser semilleros importantes para esta especie. Según Morquecho *et al.* (2014), *P. bahamense* es una especie de características termofílicas y eurihalinas que favorecen su germinación cuando la temperatura oscila entre los 25°C a 30°C y la salinidad entre los 20 UPS y 35 UPS, características que coinciden con los parámetros reportados para las estaciones de muestro ubicadas en estas áreas. Otro aspecto importante es el tipo de sedimento en estas zonas, en Tárcoles y Bahía Caldera predominan los sedimentos finos y muy finos (Vega y Quesada 2013), este tipo de sedimento permite la formación de semilleros debido a que, en los sedimentos conformados por partículas de gran tamaño, los quistes serían fácilmente resuspendidos en la columna de agua y por lo tanto se facilitaría que sean llevados hasta otras áreas, donde las condiciones del sustrato faciliten que el quiste se sedimente por periodos más prolongados (Hereid 2007).

P. bahamense var. *compressum*, produce quistes de resistencia como parte de su ciclo de vida, a diferencia de otras especies que solo utilizan esta estrategia de supervivencia cuando las condiciones ambientales son adversas (Godhe *et al.* 2001, Peperzak 2006). La producción de quistes constante incrementa la concentración de quistes de resistencia en el área donde ocurren las floraciones de esta especie, favoreciendo la realización de estudios sobre

distribución de quistes en los sedimentos e incluso es posible utilizar la abundancia y distribución de los quistes para calcular el tamaño de la población (Hereid 2007).

Con respecto a la poca abundancia de quistes de *Alexandrium sp.* y *Gyrodinium sp.* encontrados en el Golfo de Nicoya durante este trabajo, coincide con lo reportado por otros investigadores, como el caso del trabajo realizado por Kobayashi *et al.* (2001), en el cual la densidad de quistes de *G. impudicum* registrada en los sedimentos fue menor a 1 quiste por cm^3 . Es posible que estas concentraciones bajas de quistes se deban a que a diferencia del *P. bahamense*, las especies de *Gyrodinium sp.* no son formadoras activas de quistes de resistencia y por tanto no han conformado semilleros importantes dentro del Golfo. Se ha documentado, que *G. instriatum* puede germinar con mayor frecuencia que otros dinoflagelados, sin requerir un periodo obligatorio de “reposo”, incluso Shikata *et al.* (2008) en su investigación evaluaron las distintas variables que pueden influir en los procesos de germinación de los quistes de estas especies, destacando que para el caso de *G. instriatum* presenta un amplio espectro de factores que disparan la germinación y que incluso este proceso puede llevarse a cabo en total oscuridad. Esto implicaría que los quistes de estas especies sean más escasos en los sedimentos.

En este estudio las densidades para el género *Alexandrium* fueron bajas en comparación con el estudio realizado por Juliano y Garcia (2006), quienes reportaron densidades de 22 quistes por cm^3 en el caso de *Alexandrium cf. minutum* mientras que las densidades de otras especies de *Alexandrium* oscilaron alrededor de los 26 quistes por cm^3 en zonas portuarias. Esto coincide con lo obtenido en este trabajo donde las concentraciones de quistes más altas para este género fueron determinadas en la zona de Caldera. Lo anterior destaca además la importancia de la realización de estos estudios para el manejo de las aguas de lastre y su vertido en las áreas portuarias.

En el caso del quiste Tipo I se ubicaron puntos importantes de acumulación alrededor de Isla Pajarita, en la Bocana de la Isla Chira y en las cercanías de Isla Sombrero, sin embargo, en las zonas internas del golfo se registraron quistes vacíos, mientras que los quistes con contenido celular solo se localizaron en la zona externa del Golfo cerca de Bahía Caldera. Según Anderson y Wall (1978), Sarjeant *et al.* (1987), la presencia de quistes vacíos en una zona se podría explicar al considerar que el tamaño del quiste y las numerosas proyecciones que lo recubren permiten que la estructura vacía se mantenga suspendida en la columna de agua por más tiempo o se adhieran a otros organismos que junto con las corrientes los transportarían lejos de donde originalmente germinaron las células vegetativas.

5. Conclusiones

Se determinó la presencia y distribución de quistes de resistencia de *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*, *Alexandrium* spp., *Gyrodinium* sp., *Gonyaulax* sp., *Protoperidinium* sp, *Gymnodinium* cf. *catenatum*. y *Pheopolykrikos* sp. en los sedimentos del Golfo de Nicoya.

Se establecieron las bases para determinar la ubicación de semilleros de dinoflagelados potencialmente tóxicos dentro del Golfo, para ser consideradas en la implementación futura de proyectos productivos y de esta forma contribuir a mitigar los efectos adversos producto de las floraciones algales nocivas y tóxicas recurrentes en esta zona de importancia económica por el valor que tiene para la maricultura y la industria turística.

Las zonas de Tárcoles, Caldera, Isla Cedros e Isla San Lucas, no serían áreas recomendables para el establecimiento de proyectos productivos al ser consideradas como zonas de alto riesgo debido a la posibilidad de floraciones algales recurrentes, ya que, en este estudio se determinó que son zonas de acumulación de quistes viables de *P. bahamense* var. *compressum* y *Alexandrium* spp. principalmente.

El flujo de las corrientes marinas podría influir en la acumulación de los quistes de resistencia vacíos en la zona interna del Golfo. La especie Tipo I reflejó mejor este comportamiento, en el caso de *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*, *Alexandrium* sp., y *Gyrodinium* sp. esta tendencia fue menos evidente.

La cantidad de estructuras vacías del quiste Tipo I dentro de las muestras de sedimento marino sugiere que esta especie tiene una presencia importante dentro del Golfo.

Los quistes de *P. bahamense* var. *compressum* tuvieron el porcentaje de germinación más alto y las células vegetativas producto de la germinación de los quistes presentaron una tasa de crecimiento en 0.45 divisiones/día, lo que indica que probablemente los quistes resistencia de esta especie se adaptaron mejor a las condiciones del laboratorio en comparación con los quistes viables de otras especies que fueron aislados bajo las mismas condiciones.

6. Recomendaciones

Dar continuidad a este estudio para estimar la abundancia relativa de los quistes, principalmente en las estaciones donde se reportaron las especies nocivas e incorporar estos muestreos al programa de monitoreo actual ejecutado por el Laboratorio de Fitoplancton Marino de la Universidad Nacional. Se recomienda utilizar equipo que permita tomar muestras de sedimento más abundantes.

Aislar quistes de los sedimentos y analizar el comportamiento de las tasas de germinación a diferentes condiciones ambientales, como salinidad y temperatura, podrían también brindar información sobre los efectos del cambio climático en las poblaciones de dinoflagelados presentes en el Golfo de Nicoya.

Los cultivos a partir de la germinación de quistes de resistencia de *P. bahamense* var. *compressum*, serán la base para propuestas de investigación para comprender mejor el comportamiento de esta especie, la dinámica de las floraciones algales, perfil y potencial toxicológico y su crecimiento bajo ciertos escenarios futuros del cambio climático, entre otras.

Realizar estudios de series temporales para evaluar el efecto de la eutrofización cultural sobre las camas de quistes de dinoflagelados en el Golfo de Nicoya, junto con la determinación de la concentración de los nutrientes principales.

7. Bibliografía

- Anderson, D.M. & D. Wall. 1978. The potencial importance of benthic cysts of *Gonyaulax tamarensis* and *Gonyaulax excavate* in initiating toxic dinoflagellate blooms. *Journal of Phycology* 14:224-234. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1978.tb02452.x>
- Anderson, D.M. & B.A. Keafer. 1987. An endogenous annual clock in the toxic marine dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis*. *Nature* 325: 616–617. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/325616a0>.
- Anderson, D.M., D.M. Jacobson, I. Bravo & J. H. Wrenn, 1988. The unique microreticulate cyst of the naked dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Journal of Phycology* 24: 255-262. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1988.tb04241.x>
- Anderson, D. M., C. A. Stock, B. A. Keafer, A. B. Nelson, B. Thompson, D. J. McGillicuddy, M. Keller, P. A. Matra, & J. Martin. 2005. *Alexandrium fundyense* cyst dynamics in the Gulf of Maine: Deep-Sea. *Research Part II-Topical Studies in Oceanography* 52:2522-2542. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2005.06.014>
- Anderson, D. M., T. J. Alpermann, A. D. Cembella, Y. Collos, E. Masseret, & M. Montresor. 2012. The globally distributed genus *Alexandrium*: Multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae* 14: 10–35. DOI:10.1016/j.hal.2011.10.012
- Anderson, C.R., Moore, S.K., Tomlinson, M.C., Silke, J. & Cusack, C.K. 2014. Living with harmful algal blooms in a changing world: strategies for modeling and mitigating their effects in coastal marine ecosystems. In: Ellis, J.T. & Sherman, D.J. (Eds.) *Coastal and Marine Hazards, Risks, and Disasters*. Elsevier B.V., Amsterdam, 495–561. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396483-0.00017-0>
- Anglés, S., E. Garcés, T.K. Hatternrath-Lehman, & Ch.J. Glober. 2012. In situ life-cycle stages of *Alexandrium fundyense* during bloom development in Northport Harbor, New York, USA. *Harmful Algae* 16: 20-26. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.12.008>
- Alfaro-Rojas, C., E. Calvo-Vargas, M. Morera-Singler, J. L. Rojas-Martínez, A. Salas-Araya, J. Valverde-Quesada & M. Vargas-Montero. 2010. Programa de Vigilancia para la Prevención de los Efectos de las Floraciones de Algas Nocivas (FANs) para el Litoral Pacífico Costarricense. Comisión Interinstitucional para la Prevención y Control de la Marea Roja en Costa Rica. 45 p.
- Baula, I. U., R.V. Azanza, Y. Fukuyo & F.P. Siringan. 2011. Dinoflagellate cyst composition, abundance and horizontal distribution in Bolinao, Pangasinan, Northern Philippines. *Harmful Algae* 11: 33-44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.07.002>
- Blanco, J. 1988. Distribución vertical y asociación al sedimento de los quistes de dinoflagelados en la ría de Ares y Betanzos. España. *Inv. Pesq.* 52:335-344.
- Bravo, I. & I. Figueroa. 2014. Towards an ecological understanding of dinoflagellate cysts functions. *Microorganisms* 2: 11-32. DOI: 10.3390/microorganisms2010011

- Bravo, I., E. Garcés, J. Diogéne, S. Fraga, N. Sanpedro, & R. I. Figueroa. 2007. Resting cysts of the toxigenic dinoflagellates genus *Alexandrium* in recent sediments from the Western Mediterranean coast, including the first description of cysts of *A. Kutnerae* and *A. peruvianum*. *European Journal of Phycology* 41(3): 293-302. DOI: <https://doi.org/10.1080/09670260600810360>
- Bravo, I., R. I. Figueroa, E. Garcés, S. Fraga, & A. Massament. 2010. The intricacies of dinoflagellate pellicle cysts: the example of *Alexandrium minutum* cysts from a bloom-recurrent area (Bay of Baintoa, NW Spain). *Deep-Sea Research. Part II, Topical Study Oceanographic* 57: 166-174. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2009.09.003>
- Braun, M. 1992. Programa básico de monitoreo de marea roja en la XII Region. Informe final IFOP 82 p.
- Brenes, C.L., S. León & J. Chavez. 2001. Variaciones de las propiedades termohalinas en el Golfo de Nicoya. *Revista Biología Tropical* 49 (2): 145-152.
- Brosnahan, M.A.D. Fischer, C.B. Lopez, S.K. Moored, D.M. Anderson. 2020. Cyst-forming dinoflagellates in a warming climate. *Harmful Algae* 91 101728. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101728>
- Brugnoli, E. 1998. Factores bióticos y abióticos que regulan la estructura y dinámica de la comunidad fitoplanctónica en la zona de Punta Morales, Golfo de Nicoya, Tesis de Postgrado de la Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica. 132 p.
- Brugnoli, E. & A. Morales. 2001. Comunidad fitoplanctónica de Punta Morales, Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Revista Biología Tropical* 49 (2): 11-17.
- Brugnioli-Oliveira, E. & A. Morales-Ramirez. 2008. Trophic planktonic dynamics in a tropical estuary, Gulf of Nicoya, Pacific Coast of Costa Rica during El Niño 1997 event. *Revista de biología marina y oceanografía* 43 (1): 75-89. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572008000100008>.
- Bujak, J.P. & G.L. Williams. 1981. The evolution of dinoflagellates. *Canadian Journal of Botany* 59: 2077-2087. DOI: <https://doi.org/10.1139/b81-270>
- Calvo-Vargas, E. & M. Arguedas-Rodríguez. 2012. Monitoreo de las Floraciones Algales en el Golfo de Nicoya, Puntarenas, Costa Rica. Universidad Nacional: Heredia-Costa Rica. Recuperado de: http://www.observatorioambiental.una.ac.cr/index.php?option=com_booklibrary&task=view&id=18&catid=45&Itemid=37
- Calvo-Vargas, E., K. Berrocal, J. Boza. 2016. Floraciones algales nocivas durante el periodo 2008-2010 en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Revista Marino Costera* 8 (1): 129-149 DOI: <http://dx.doi.org/10.15359/revmar.8-1.9>
- Calvo-Vargas, E. 2019. Registro de Floraciones Algales en el Golfo de Nicoya. Comunicación personal.
- Cucchiari, E., P. Rossella, L. Pezzolesi, A. Penna, C. Battocchi, F. Cerino & C. Totti. 2010. Resting cysts of *Fibrocaspa japonica* (Raphidophyceae) from coastal sediments of the

- northern Adriatic Sea (Mediterranean Sea). *Harmful Algae* 10: 81-87. DOI: <http://dx.doi.org/10.12681/mms.1770>
- Dale, B. 2001. The sedimentary record of dinoflagellate cysts: looking back into the future of phytoplankton blooms. *Scientia Marina* 63 (2): 257-272. DOI: 10.3989/scimar.2001.65s2257
- Etheridge, S.M. 2010. Paralytic shellfish poisoning: Seafood safety and human health perspectives. *Toxicon* 56: 108-122. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.12.013. Epub 2009 Dec 24.
- Figuerola, R. I., E. Garcés & I. Bravo. 2007. Comparative study of the life cycles of *Alexandrium tamutum* and *Alexandrium minutum* (Gonyulacales, Dinophyceae) in culture. *Journal of Phycology* 43: 1039-1053. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00393.x>
- Figuerola, R. I., I. Bravo, E. Garcés & I. Ramilo. 2006. Nuclear features and effect of nutrients on *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) sexual stages. *Journal of Phycology* 42: 67-77. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00181.x>
- Figuerola, R. I., J.A. Vazquez, A. Massenet, M. A. Murado & I. Bravo. 2011. Interactive effects of salinity and temperature on planozygote and cyst formation of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) in culture. *Journal of Phycology* 47: 13-24. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00937.x>
- Figuerola R.I., M. Estrada, E. Garcés. 2018. Life histories of microalgal species causing harmful blooms: Haploids, diploids and the relevance of benthic. *Harmful Algae* 73: 44-57. DOI: 10.1016/j.hal.2018.01.006. Epub 2018 Feb 4.
- Fischer, A. D. 2017. *Alexandrium catenella* cyst dynamics in a coastal embayment: temperature dependence of dormancy, germination, and bloom Initiation. Tesis de Doctorado. 165 p. DOI:10.1575/1912/9058, <https://hdl.handle.net/1912/9058>
- Garcés, E., I. Bravo, M. Vila, R. I. Figuerola, M. Masó & N. Sanpedro. 2004. Relationship between vegetative cells and cyst production during *Alexandrium minutum* bloom in Arenys de Mar harbour (NW Mediterranean). *Journal Plankton Reserch* 26: 1-9. DOI: <https://doi.org/10.1093/plankt/fbh065>
- Gárate-Lizárraga, I., V.M.G. Sevilla-Torres, M. Álvarez-Añorve, F. Aguirre, J. Violante-González & A. Rojas-Herrera. 2013. First record of a red tide caused by *Gyrodinium instriatum* (Dinophyceae: Gymnodiniales) in Bahía de Acapulco, Guerrero. *CICIMAR, Océanides*. 28: 43-47.
- Gedaria, A.I, B. Lucas, K. Reinhardt & R. V. Azanza. 2007. Growth response and toxin concentration of cultured *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* to vaying salinity and temperature conditions. *Toxicon* 50: 518-529. DOI: 10.1016/j.toxicon.2007.04.021
- Gracia, S., S. Roy & M. Starr. 2013. Spatial distribution and abundance of *Alexandrium tamarense* resting cysts in surface sediments from St. Lawrence Estuary, Estearn Canada. *Estuarine, coastal and shelf science* 121-122: 20-32. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2013.01.019>

- Graham, L.E., J.M Graham & L. Wilcox. 2009. *Algae*. 2^o Edition. Person Education, Inc., San Francisco, United States of America. 700p.
- Godhe, A., F. Noren, M. Kuylenstierna, C. Ekberg & B. Karlson. 2001. Relationship between planktonic dinoflagellate abundance, cysts recovered in sediment traps and environmental factors in the Gullmar Fjord, Sweden. *Journal of Plankton Research* 23 (9): 923-938. DOI: <https://doi.org/10.1093/plankt/23.9.923>
- Hamdan, N.A., M.S.A. Hassan, N.M. Noor, S.A. Hamid & N.M., Bunnori. 2017. Dinoflagellates: Ecological Approaches and Spatial Distributions in Malaysia Waters. *Journal of Oceanography of Marine Research* 5 (3): 164-170. DOI: 10.4172/2572-3103.1000164
- Hansen, P.J, N. Lundholm & B. Rost. 2007. Growth limitation in marine red-tide dinoflagellates: Effects of pH versus inorganic carbon availability. *Marine Ecology Progress Series* 334:63-71. DOI: 10.3354/meps334063
- Harland, R. 1988. Dinoflagellates. Their cysts and quaternary stratigraphy. *New phytologist* 108:111-120.
- Head, M.J., V. Pospelova, T. Radi & F. Marret. 2019. *Stelladinium bifurcatum* n. sp., a distinctive extant thermophilic heterotrophic dinoflagellate cyst from the late Quaternary of the eastern Pacific and east equatorial Atlantic oceans. *Marine Micropaleontology*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marmicro.2019.101754>
- Heikkilä, M. V. Pospelova, K. P. Hochheim, Z. Z. A. Kuzyk, G. A. Stern, D. G. Barber & R. W. Macdonald. 2014. Surface sediment dinoflagellate cysts from the Hudson Bay system and their relation to freshwater and nutrient cycling. *Marine Micropaleontology* 106: 79-109. DOI: 10.1016/j.marmicro.2013.12.002
- Hereid, K. 2007. *Pyrodinium Bahamense* var. *Bahamense* cyst as a dinoflagellate population and deposition proxy in Puerto Mosquito, Vieques, Puerto Rico. 20th Annual Keck Symposium; <http://keck.wooster.edu/publications> , recuperado de: <https://keckgeology.org/files/pdf/symvol/20th/puertorico/hereid.pdf>
- Ichimi, K. & S. Montani. 2001. Effects of deposit feeder ingestion on the survival and germination of marine flagellate cysts. *Fisheries Sci.* 67: 1178–1180. DOI: 10.1046/j.1444-2906.2001.00378.x
- Jimenez, R. 1993. Ecological factors related to *Gyrodinium instriatum* bloom in the inner estuary of the Gulf of Guayaquil. In: Smayda, T.J. & Y. Shimizu (Eds.) *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, New York, 257–262
- Juliano, V.B. & V.M.T. Garcia. 2006. Cysts of potentially harmful dinoflagellates, with emphasis on the genus *Alexandrium*, in Sepetiba Bay (Brazil) during a port survey of GloBallast, *African Journal of Marine Science*, 28(2):299-303. DOI: 10.2989/18142320609504166
- Kobayashi, S., N. Kojima, S. Itakura, I. Imai & K. Matsuoka. 2001. Cyst morphology of a chain-forming unarmored dinoflagellate *Gyrodinium impudicum* Fraga et Bravo. *Phycological Research* 49: 61–65 DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1440-1835.2001.00223.x>

- Kojima, N. & S. Kobayashi. 1992. Motile cell-like cyst of *Gyrodinium instriatum* Freudenthal et Lee (Dinophyceae). Review of Palaeobotany and Palynology, 74 (I): 239-247 DOI: [https://doi.org/10.1016/0034-6667\(92\)90009-6](https://doi.org/10.1016/0034-6667(92)90009-6)
- Kremp, A. & A.S. Heisaken. 1999. Sexuality and cyst formation of the spring-bloom dinoflagellate *Scropsiella hangoei* in the coastal northern Baltic Sea. Marine Biology 134:771-777. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002270050594>
- Lee, R.E. 2008. Phycology. 4th Edition. Cambridge University Press, New York, United States. 614 p.
- Lembeye, G. 2004. Distribución de quistes de *Alexandrium catenella* y otros dinoflagelados en sedimentos de la zona Sur-Austral de Chile. Ciencia y Tecnología del Mar. 27: 21-31.
- León-Coto, S., N. Kress, C. L. Brenes-Rodríguez, & S. Brenner. 1998. Una contribución a la ecología del Golfo de Nicoya. Uniciencia, 15(16): 35-37.
- Lewis, J., J.D. Taylor, K. Neale & S.A.G. Leroy. 2018. Expanding known dinoflagellate distributions: investigations of slurry cultures from Caspian Sea sediment. Botánica Marina 2018; 61(1): 21–31. DOI: <https://doi.org/10.1515/bot-2017-0041>.
- Li, Y., N. Tang, P. Shen, G. Li & Y. Tan. 2019. Distribution of harmful dinoflagellate cysts in the surface sediments of Daya Bay of the South China Sea and their relationship to environmental factors. International Biodeterioration & Biodegradation. 139: 44-53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.02.006>
- Liu, M., H. Gu, B. Krock, Z. Luo & Y. Zhang. 2020. Toxic dinoflagellate blooms of *Gymnodinium catenatum* and their cyst in Taiwan Strait and their relationship to global populations. Harmful Algae. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101868>
- Lizano, O. & J.A. Vargas. 1996. Distribución espacio-temporal de la temperatura y salinidad en la parte interna del Golfo de Nicoya. Tecnología en Marcha 12 (2):3-16.
- Lopez, C.B., A. Karim, S. Murasko, M. Marot, C.G. Smith & A.A. Corcoran. 2019. Temperature mediates secondary dormancy in resting cysts of *Pyrodinium bahamense* (Dinophyceae). Journal Phycology. 55: 924–935. DOI: 10.1111/jpy.12883
- Martínez, F. 1988. La pesquería del camarón en el litoral pacífico costarricense: Misión Técnica Española II. Centro Regional de Pesca, Puntarenas, Costa Rica.
- Martínez, T. 2011. Comparación morfológica y toxicológica de las poblaciones de *Pyrodinium bahamense* Plate del sur del Golfo de California (Mexico). Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología. Unidad Académica de Mazatlán, Universidad Autónoma de Mexico.
- Matrai, P., B. Thompson & M. Keller. 2005. Circannual excystment of resting cysts of *Alexandrium spp.* from eastern Gulf of Maine populations. Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr. 52 (19–21): 2560–2568. DOI: 10.1016/j.dsr2.2005.06.013
- Matsunaga, T., H. Takeyama, H. Miyashita & H. Yokoushi. 2005. Marine Microalgae. Biotechnology 96: 165-168. DOI: 10.1007/b135784

- Matsuoka, K. & T. Takeuchi. 1995. Productivity of vegetative cells, planozygotes and calcified cysts dinoflagellate *Alexandrium catenella* (Whedon et Kofoid) Balech based on the field observation. *Fossils* 59: 41-56.
- Matsuoka, K. & Y. Fukuyo. 2000. Guía técnica para el estudio de quistes de dinoflagelados actuales. WESTPAC-HAB/WESTPAC/IOC.
- Miyazono, A., S. Nagai, I. Kudo & K. Tanizawa. 2012. Viability of *Alexandrium tamarense* cysts in the sediment of Funka Bay, Hokkaido, Japan: Over a hundred year survival times for cysts. *Harmful algae* 16: 81-88. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.02.001>
- Morales-Ramírez, A., R. Viquez, K. Rodríguez & M. Vargas. 2001. Marea roja producida por *Lingulodinium polyedrum* (Peridinales, Dinophyceae) en Bahía Culebra, Golfo de Papagayo, Costa Rica. *Revista Biología Tropical* 49(2): 19-23.
- Morquecho, L., R. Alonso-Rodríguez & G. A. Martínez-Tecuapacho. 2014. Cyst morphology, germination characteristics, and potential toxicity of *Pyrodinium bahamense* in the Gulf of California. *Botánica Marina* 57(4): 303–314. DOI: 10.1515/bot-2013-0121
- Morquecho, L. 2019. *Pyrodinium bahamense* One the Most Significant Harmful Dinoflagellate in Mexico. *Frontiers of Marine Science* 6 (1). Doi:<https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00001>
- Mustakim, G. R., S. M. Shaleh & M.N.A. Ayub. 2019. Effect of different concentration of soil extracts on the growth of *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies* 7(5): 353-355
- Onda, D.F.L., A. O. Lluisma & R. V. Azanza. 2014. Development, morphological characteristics and viability of temporary cysts of *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* (Dinophyceae) *in vitro*. *European Journal of Phycology*, 49:3 265-275. DOI: 10.1080/09670262.2014.915062
- Omura, T. & Y. Fukuyo. 2002. Physiological characteristics of two varieties of *Pyrodinium bahamense*. *Fisheries Science*. 523-524. DOI: 10.2331/fishsci.68.sup1_523
- Parsons, T.R. & P.J Harrison. 1983. Nutrient cycling in marine ecosystems. In: Richards, B., Charley, J.L. (Eds.), *Physiological Plant Ecology IV. Ecosystems and Processes*. Springer-Verlag, Heidelberg. 85–115 pp.
- Peña-Manjarrez, J.L., G. Gaxiola-Castro, J. Helenes-Escamilla & E. Orellana-Cepeda. 2001. Quistes de *Lyngulodinium polyedrum*, productor de mareas rojas en la Bahía de Todos los Santos (Invierno, primavera, 2000). *Revista de Ciencias Marinas* 27(4): 543-558.
- Peperzak, L. 2006. Modelling vegetative growth, gamete production and encystment of dinoflagellates in batch culture. *Marine Ecology-Progress Series* 306: 143-152. DOI: 10.3354/meps306143
- Peta J. M., F. Marret, K. N. Mertens, L. Shumilovskikh & S.A.G. Leroy. 2017. Atlas of modern dinoflagellate cyst distributions in the Black Sea Corridor: from Aegean to Aral Seas, including Marmara, Black, Azov and Caspian Seas. *Marine Micropaleontology* 1: 134–152. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marmicro.2017.05.004>

- Peterson, C.L. 1960. La oceanografía física del Golfo de Nicoya, Costa Rica, un estuario tropical. Comisión Interamericana del Atún Tropical. Boletín 4: 80 p.
- Phlips, E.J., S. Badylak & T. Grosskopf. 2002. Factors affecting the abundance of phytoplankton in a restricted subtropical lagoon, the Indian River Lagoon, Florida, USA. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 55: 385–402. DOI: 10.1006/ecss.2001.0912
- Plate, L. 1906. *Pyrodinium bahamense* n. g., n. sp. Die Leucht-Peridineedes 'Feuersees' von Nassau, Bahamas. *Archiv für Protistenkunde* 7:411–429.
- Pospelova, V., G.L. Chmura, W.S. Boothman & J.S. Latimer. 2002. Dinoflagellate cyst records and human disturbance in two neighboring estuaries, New Bedford Harbor and Apponagansett Bay, Massachusetts (USA). *Science Total Environmental* 298:81–102 DOI: [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00195-X](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00195-X)
- Regendfors, K., I. Karlsson & L.A. Hansson. 1998. Algal Cysts Dormancy: A temporal escape from herbivory. *Biological Sciences* 265 (1403): 1353-1358. DOI: 10.1098/rspb.1998.0441
- Reguera, B. 2002. Establecimiento de un programa de seguimiento de microalgas tóxicas. En: Sar E.A., Ferrario M. E., Reguera B. (Eds). *Floraciones algales nocivas en el Cono Sur Americano*. Instituto Nacional de Oceanografía. Madrid, España. 21-56 pp.
- Reidhaar, P., C.S. Lane, C. R. Benitez-Nelson & D. W. Gamble. 2015. Spatial and temporal variations in *Pyrodinium bahamense* cyst concentrations in the sediments of bioluminescent Magrove Lagoon, St. Croix, USVI. *Estuaries and Coasts, Journal of the Coastal and Estuarine Research Federation*, 39:682–694 DOI: 10.1007/s12237-015-0032-6
- Salgado, P. 2017. Estudio de dos especies de dinoflagelados marinos productores de Floraciones Algales Nocivas (FANs): *Alexandrium ostenfeldii* y *Protoceratium reticulatum*. Tesis Doctoral. Escola Internacional de Doutoramento, Universidad de Vigo. 179 p.
- Sar E.A., M.E. Ferrario & B. Reguera. 2002. *Floraciones algales nocivas en el Cono Sur Americano*. Instituto Nacional de Oceanografía, Madrid, España. 311 p.
- Sarjeant, W.S.A., T. Lacalli & G. Gaines. 1987. The cysts and Skeletal elements of dinoflagellates: Speculations on the ecological causes for their morphology and development. *Micropaleontology* 33(1): 1-36. DOI: 10.2307/1485525
- Shikata, T., S. Nagasoe, T. Matsubara, Y. Yamasaki, Y. Shimasaki, Y. Oshima, T. Uchida, I. Jenkinson & T. Honjo. 2008. Encystment and excystment of *Gyrodinium instriatum* Freudenthal et Lee. *Journal of Oceanography*. 64: 355-365. DOI: 10.1007/s10872-008-0028-y.
- Tobin, E. & R. Horner. 2011. Germination Characteristics of *Alexandrium catenella* cysts from surface sediments in Quartermaster Harbor, Puget Sound, Washington, USA. *Harmful Algae* 10: 216-223. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2010.10.002>

- Usup, G., A. Ahmad, K. Matzuoka, P.T. Lim & Ch. P. Leaw. 2012. Biology, ecology and bloom dynamics of the toxic marine dinoflagellate *Pyrodinium bahamense*. Harmful Algae 14: 301-312. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.026>
- Van Hauwaert, T. 2016. Recent dinoflagellate cysts from the Chesapeake estuary (Maryland and Virginia, U.S.A.): taxonomy and ecological preferences. Master's dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Science in Geology. 97 p. Recuperado de: https://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/002/272/630/RUG01-002272630_2016_0001_AC.pdf
- Vargas, A. 1995. The Gulf of Nicoya estuary, Costa Rica: past, present and future cooperative research. Helgoländer Meeresunters 49: 821-828. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02368405>
- Vargas, M. 2001. Taxonomía y ultraestructura de algunas especies de dinoflagelados del Golfo de Nicoya, Costa Rica. Tesis de Licenciatura, Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional. 83 p.
- Vargas-Montero, M. & E. Freer. 2002. Descripción morfológica y ultraestructural de floraciones algales nocivas en el golfo de Nicoya, Costa Rica y su impacto en la salud. Revista Costarricense de Ciencias Médicas 23 (3-4): 115-132. Recuperado de: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S02532948200200020002&lng=es&nrm=iso. ISSN 0253-2948.
- Vega, H. & R. Quesada. 2013. Aceleración y posicionamiento de las PYMES competitivas de la Región Pacífico Central mediante un Plan Estratégico Interuniversitario Regional: Evaluación Ambiental de zonas marino costeras de uso para las PYMES. II Informe trimestral. Universidad Nacional. 2013. 54 p.
- Verleye, T.J., V. Pospelova, K.N. Mertens & S. Louwye. 2011. The geographical distribution and (paleo)ecology of *Selenopemphix undulate* sp. nov., a new late quaternary dinoflagellate cyst from the Pacific Ocean. Marine Micropaleontology 78: 65-83.
- Versteegh, G. J. M. & K. A. F., Zonneveld. 2002. Use of selective degradation to separate preservation from productivity. Geology 30(7): 615-618. DOI: [https://doi.org/10.1130/0091-7613\(2002\)030<0615:UOSDTS>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1130/0091-7613(2002)030<0615:UOSDTS>2.0.CO;2)
- Viquez, R. & P. H. Hargraves. 1995. Annual cycle of potentially harmful dinoflagellates in the Golfo de Nicoya, Costa Rica. Bulletin of Marine Science 57(2): 467-475.
- Viquez, R. 1999. Floraciones algales potencialmente nocivas y la acumulación de las esporas en el Golfo de Nicoya. Curso Cultivo de Microalgas Tóxicas en Investigación y Programas de Vigilancia. Comisión Oceanográfica Intergubernamental de la UNESCO. Centro Oceanográfico de Vigo, España. 3p.
- Voorhis, A. D., C. E. Epifanio, D. Maurer, A. I. Dittel & J. A. Vargas. 1983. The estuarine character of the Gulf of Nicoya, an embayment on the Pacific coast of Central America. Hydrobiologia 99: 225-237. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00008774>
- Wall, D. & B. Dale. 1968. Modern Dinoflagellates Cysts and Evolution of the Peridinales. Micropaleontology 14(3): 265-304. DOI: 10.2307/1484690

Wong, Ch. K., P. Hung, H. C.C. Ng, S. Lee & K. Kam. 2011. Cluster analysis of toxins profile patterns as a tool for tracing shellfish contaminated with PSP-toxins. *Environmental Research* 111: 1083-1090. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2011.06.013>

Yamaguchi, M., I. Itakuba, K. Nagasaki, & Y. Kotani, 2002. Distribution and abundance of resting cysts of the toxic *Alexandrium spp.* (Dinophyceae) in sediments of the western Seto Inland Sea, Japan. *Fisheries Science* 68: 1012-1019. DOI: 10.1046/j.1444-2906.2002.00526.x

Zonneveld, K. A. F., G. J. M. Versteegh, & C. J. de Lange. 2001. Palaeoproductivity and post-depositional aerobic organic matter decay reflected by dinoflagellate cyst assemblages of the Eastern Mediterranean S1 sapropel: *Marine Geology*, 172 (3-4):181-195. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0025-3227\(00\)00134-1](https://doi.org/10.1016/S0025-3227(00)00134-1)

8. Anexos

Anexo 1. Coordenadas geográficas de las estaciones de muestreo, golfo de Nicoya, Puntarenas, Costa Rica.

Nombre	Latitud	Longitud
Herradura	9°37'600'' N	84°41'900'' W
Punta Leona	9°42'400'' N	84°41'900'' W
Tárcoles	9°45'700'' N	84°41'900'' W
Bahía Caldera	9°52'200'' N	84°47'200'' W
Chomes	10°01'424'' N	84°55'595'' W
Punta Morales	10°04'141'' N	84°57'550'' W
Islas Cortezas	10°04'271'' N	84°58'313'' W
Costa de Pájaros	10°05'710'' N	84°59'840'' W
Isla Pajarita	10°05'953'' N	84°59'877'' W
Bocana externa (Isla Chira)	9°59'122'' N	85°01'850'' W
Bocana interna (Isla Chira)	10°06'394'' N	85°05'154'' W
Montero centro	10°08'474'' N	85°09'974'' W
Montero Manglar	10°07'563'' N	85°10'946'' W
Puerto Palito	10°04'545'' N	85°11'147'' W
Isla Sombrero	10°02'120'' N	85°07'116'' W
Isla Berrugate	10°03'010'' N	85°09'173'' W
Isla Bejuco	10°00'317'' N	85°02'378'' W
Isla Venado	9°59'832'' N	85°04'518'' W
Isla Caballo	9°58'730'' N	84°57'565'' W
Entre San Lucas y Caballo	9°58'477'' N	84°55'978'' W
Isla Cedros	9°50'754'' N	84°52'973'' W

Anexo 2. Técnica para la separación de quistes del sedimento con solución de polytungstato de sodio (SPS)(Bravo *et al.* 2007).

Material y métodos:

- ◆ Probeta de 50 mL.
 - ◆ Caja de petri.
 - ◆ Agitador de vidrio.
 - ◆ Micropipetas Pasteaur.
 - ◆ Beaker de 50 mL.
 - ◆ Agua fría (aproximadamente 500 mL)
 - ◆ Espátula.
 - ◆ Tubos para centrifuga de 15 mL.
 - ◆ Gradilla para tubos para centrifuga.
 - ◆ Regla milimétrica.
 - ◆ Pipeta con agua de mar filtrada.
 - ◆ Tamices (125 μm y 20 μm).
 - ◆ Pizeta con agua destilada.
 - ◆ Solución de Polytungstato de Sodio (densidad 2g/mL).
 - ◆
1. Colocar los tubos que contienen los sedimentos en un baño de agua fría.
 2. Agregar 10 mL de agua de mar filtrada a una probeta de 50 mL.
 3. Agregar de 1 a 1,5 cm de sedimento en la probeta con los 10 mL de agua de mar filtrada y de 3 a 5 cm para los sedimentos arenosos.
 4. Mezclar muy bien los sedimentos con un agitador de vidrio. Anotar el volumen inicial de los sedimentos.
 5. Pasar todo el contenido de la probeta a un beaker de 50 mL, lavar muy bien la probeta con agua marina filtrada hasta aproximadamente 35 mL.
 6. Sonificar a intensidad baja durante 1,5 minutos en un baño de agua fría.
 7. Lavar el sedimento con agua de mar filtrada sobre una serie de tamices de 125 y 20 μm .
 8. Lavar tamiz de 20 μm con agua de mar filtrada, pasar toda la muestra (pregradiente) a un tubo de centrifuga plástico de 15 mL. Anotar el volumen.
 9. Tomar parte del pregradiente o todo según lo concentrado que se vea. Centrifugar a 1000 rpm por 15 minutos y a 10°C.
 10. Retirar el sobrenadante y agregar la solución de polytungstato de sodio con una densidad de 2g/mL (SPS) a un volumen del doble de la muestra de sedimento.
 11. Homogenizar la muestra en un Vortex.

12. Centrifugar a 700 rpm por 15 minutos a 10°C.
13. Verter el sobrenadante sobre el tamiz de 20 μm y lavar con agua de mar filtrada para eliminar el SPS.
14. Recoger la muestra en un tubo de 15 mL. Observar al microscopio.

Si no es posible observar inmediatamente al microscopio la muestra se debe guardar en la refrigeradora por poco tiempo.

Anexo 3. Aislamientos celulares por micromanipulación capilar (Reguera 2002)

Material y métodos.

- ◆ Pipetas Pasteur o pipetas microcapilares estériles que se han afinado previamente al fuego hasta conseguir un orificio de entrada ligeramente mayor al diámetro de las células que se pretenden aislar. Es importante evitar que queden aristas cortantes al cortar la punta estirada al fuego. Para ello se puede cortar la boca del capilar con un cortador de diamantes similar al que usan los relojeros; otra medida puede ser cortar con un movimiento rápido mientras se sujeta con ambas manos el extremo a partir y posteriormente pasar rápidamente el corte realizado por la llama para “sellar” las aristas, procurando no sobrecalentar el capilar para evitar que se cierre la punta.
 - ◆ Portaobjetos
 - ◆ Agua de mar filtrada (0.45 μm -0.22 μm) y esterilizada.
 - ◆ Microplacas de cultivos celulares, con pocillos de 3 mL (24 pocillos distribuidos en rectángulos de 6 filas por 4 columnas), rellenos con medio de cultivo.
1. Se coloca aproximadamente 1 ó 2 gotas de la muestra obtenida de la separación de quistes del sedimento con solución de polytungstato de sodio, en un portaobjetos de vidrio.
 2. Se aíslan los quistes, uno por uno, al microscopio invertido utilizando pipeta microcapilar, se transfieren a otro portaobjetos que contiene dos ó tres gotas separadas de medio de cultivo L1, para ser lavados y así separarlos del material acompañante. Se repite esta operación 2-3 veces con el fin de asegurar que los quistes queden libres de microorganismos no deseados.

3. Se colocan los quistes en los pocillos de las cámaras de cultivo que contienen el medio L1. Cada pocillo está identificado por coordenadas (letra de la fila y número de la columna; además es importante indicar en la hoja de control la posición del quiste dentro del pocillo) con lo que se facilita el seguimiento del quiste. Se incuban los quistes en cámaras bajo condiciones de luz, temperatura y fotoperiodo lo más próximo posible a las condiciones ambientales de donde se tomaron las muestras.
4. Observar periódicamente los quistes de resistencia contenidos en los pocillos. Se anota en un cuaderno la evolución del mismo.

Anexo 4. Preparación del medio de cultivo L1, (Guilard y Hargraves 1993)

Se parte de agua de mar almacenada que ha sido filtrada y a la cual se le ha corregido la salinidad a 31 pts. Se adiciona 1 ml de cada una de las soluciones stock (nitratos, fosfatos y metales) y vitaminas (tiamina, biotina y cianocobalamina), elaboradas previamente, por cada litro de medio que se requiera elaborar. No es necesario agregar silicatos al medio L1, debido a que los dinoflagelados no requieren de este nutriente.

Preparación de soluciones stock.

Solución de nitratos:

Se disuelven 75.05g de NaNO_3 en 1 L de agua destilada, se autoclava en una botella de teflón o de vidrio estéril y se deja enfriar rápidamente.

Se almacena en la refrigeradora.

Solución de fosfatos:

Se disuelven 5.01g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 1L de agua destilada, se autoclava en una botella de teflón o de vidrio estéril y se deja enfriar rápidamente.

Se almacena en la refrigeradora.

Solución de metales:

- ◆ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2.5 g/L
- ◆ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 23.0 g/L
- ◆ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 11.90 g/L
- ◆ $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 178.12 g/L

- ◆ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 21.78 g/L
- ◆ SeO_4 1.12 g/L
- ◆ $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.63 g/L
- ◆ Na_3VO_4 1.84 g/L
- ◆ K_2CrO_4 0.19 g/L

Se disuelven 4.36 g de Na_2 EDTA en agua destilada (aproximadamente en 400 mL).

Se disuelven 3.16 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada (aproximadamente en 400 mL).

Posteriormente ambas soluciones se depositan en un balón aforado y se les añade 1 mL de cada una de las 9 soluciones de metales previamente preparados y se completa hasta 1 L con agua destilada, en un matraz aforado.

Se pasa el litro de solución a un recipiente de teflón y se autoclava.

Se deja enfriar rápidamente y se almacena a temperatura ambiente.

Solución de vitaminas:

Se prepara una solución de:

- ◆ Biotina: 0.51 g/L en agua destilada.
- ◆ Cianocobalamina: 0.50 g/L en agua destilada.

Se almacenan en el congelador.

Se prepara una solución de Tiamina. HCL 101.2 mg en unos 900 mL se le añade 1mL de la solución de biotina y 1 mL de la solución de cianocobalamina. Se completa hasta 1 L con agua destilada en un matraz aforado y se reparte en alícuotas (para facilitar su uso). Se envuelven con papel parafilm y se guardan en el congelador hasta su uso.