

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA



**EFECTO COMBINADO DE LA TEMPERATURA Y SALINIDAD SOBRE
PARÁMETROS FISIOLÓGICOS DE LAS ESPECIES ICTIOTÓXICAS *Heterosigma*
akashiwo y *Pseudochattonella verruculosa***

ALONDRA ELENA SANDOVAL SANHUEZA

SEMINARIO DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

CONCEPCIÓN - CHILE

ABRIL, 2020



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA



**EFFECTO COMBINADO DE LA TEMPERATURA Y SALINIDAD SOBRE
PARÁMETROS FISIOLÓGICOS DE LAS ESPECIES ICTIOTÓXICAS *Heterosigma
akashiwo* y *Pseudochattonella verruculosa***

Por

ALONDRA ELENA SANDOVAL SANHUEZA



Profesor guía

PATRICIO ANDRÉS DÍAZ GÓMEZ

SEMINARIO DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

CONCEPCIÓN - CHILE

ABRIL, 2020

Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Este Seminario de Título ha sido realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo de Recursos y Ambientes Costeros, Centro i~mar. Universidad de Los Lagos.

Profesor Guía:

Dr. Patricio Díaz Gómez
Centro i~mar
Universidad de Los Lagos, Puerto Montt

Comisión Evaluadora:

Dr. Alejandra Aguilera Belmonte
Facultad de Medicina y Ciencia
Universidad San Sebastián, Puerto Montt



Dr. Mauricio Urbina Foneron
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción, Concepción

Coordinadora Seminario de Título:

Dr. Fernando Cruzat Cruzat
Unidad de Biotecnología Marina
Universidad de Concepción, Concepción

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi madre y a mi hermano Abraham que gracias a su apoyo incondicional he logrado concluir mi carrera. Agradezco su enorme amor y entrega en cada momento de mi desarrollo como persona y ahora como profesional. Ustedes son los que siempre me han motivado a conseguir todo lo que me propongo. Este logro también es suyo.



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi profesor guía Dr. Patricio Díaz, por su gran apoyo, motivación y disponibilidad durante este periodo. Gracias por alentarme cada vez que lograba un buen resultado, todos deberían tener un tutor como usted. Un sincero agradecimiento a mi co-tutora Alejandra Aguilera por su disposición y conocimiento entregado durante el desarrollo de esta tesis. También quiero agradecer a Sandra Oyanedel por enseñarme todo sobre cultivo celular, ya que gran parte de este trabajo lo realicé en constante colaboración con ella. Finalmente, agradecer a todos los que de algún modo me ayudaron en el Centro i~mar, a los que me prestaron material y me dieron consejos en el laboratorio.



ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	9
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. HIPÓTESIS	18
1.2. OBJETIVOS	18
2. MATERIALES Y MÉTODOS	19
2.1. ORIGEN DE LAS CEPAS	19
2.2. AISLAMIENTO DE LAS CEPAS	21
2.3. CONDICIONES DE CULTIVO Y PRE-ACLIMATACIÓN	22
2.4. ACLIMATACIÓN DE LAS CEPAS	22
2.5. CURVAS DE CRECIMIENTO	24
2.6. TASAS DE CRECIMIENTO	24
2.7. DETERMINACIÓN DE LA CONDICIÓN ÓPTIMA DE CRECIMIENTO	25
2.8. TRATAMIENTO DE EXPOSICIÓN DE MICROALGAS	25
2.9. CRECIMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR CHSE-214	26
2.10. PREPARACIÓN DE MICROPLACAS CON LÍNEA CELULAR CHSE-214	27
2.11. CONTEO CELULAR MEDIANTE HEMOCITÓMETRO	27
2.12. ENSAYO MTT	28
2.13. DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE MTT	28

3. <u>RESULTADOS</u>	31
3.1. PARÁMETROS DE CRECIMIENTO DE <i>H. AKASHIWO</i> Y <i>P. VERRUCULOSA</i>	31
3.2. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ICTIOTÓXICO DE LA ESPECIE <i>H. AKASHIWO</i> EN LÍNEAS CELULARES DE SALMÓN CHINOOK (CHSE-214) A TRAVÉS DE ENSAYO MTT 33	
3.3. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ICTIOTÓXICO DE LA ESPECIE <i>P. VERRUCULOSA</i> EN LÍNEAS CELULARES DE SALMÓN CHINOOK (CHSE-214) A TRAVÉS DE ENSAYO MTT 36	
4. <u>DISCUSIÓN</u>	38
4.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA, SALINIDAD Y CONDICIÓN ÓPTIMA DE CRECIMIENTO EN CULTIVOS DE <i>H. AKASHIWO</i> Y <i>P. VERRUCULOSA</i>	40
4.2. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ICTIOTÓXICO DE LAS ESPECIE <i>H. AKASHIWO</i> Y <i>P. VERRUCULOSA</i> EN LÍNEAS CELULARES DE SALMÓN CHINOOK (CHSE-214) A TRAVÉS DE ENSAYO MTT	41
5. <u>CONCLUSIONES</u>	45
RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS	47
6. <u>LITERATURA CITADA</u>	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tasas de crecimiento y densidades celulares máximas de *Heterosigma akashiwo* y *Pseudochattonella verruculosa* cultivadas bajo tres combinaciones de temperatura y salinidad. Los valores representan las medias \pm desviación estándar de los recuentos celulares por triplicado..... 31



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Células de *Heterosigma akashiwo* observadas bajo microscopio invertido a 40X de cultivos monoalgales. A) Célula piriforme de *H. akashiwo*. B) Célula vegetativa pequeña con núcleo conformado (punta de flecha). C) Célula vegetativa en forma de “mora” por efecto del aumento de luz. D) Célula vegetativa con flagelo más largo (punta de flecha) 19

Figura 2. Células de *Pseudochattonella verruculosa* observadas bajo microscopio invertido a 40X de cultivos monoalgales. A) Célula vegetativa con una protuberancia en la base del flagelo (punta de flecha). B) Célula vegetativa con forma esférica pequeña. C) Célula vegetativa con flagelo largo (punta de flecha negra) y eyecciones de los mucocistos (punta de flechas rojas). D) Célula vegetativa redonda con mucocistos en la periferia de la célula (punta de flechas rojas), acompañadas de células hijas (punta de flechas negras) 20

Figura 3. A) Área de detección en el sur de Chile. B) Zonas de obtención de *H. akashiwo* y *P. verruculosa* durante floraciones registradas en los años 2013 y 2016..... 21

Figura 4. Cámara de aclimatación con cultivos de las especies ictiotóxicas *H. akashiwo* y *P. verruculosa* a 15°C y distintas combinaciones de salinidades (10, 20 y 30 psu) 23

Figura 5. Batería de combinaciones, en términos de temperatura y salinidad para las especies ictiotóxicas, *H. akashiwo* y *P. verruculosa*, con el fin de determinar la condición óptima de crecimiento..... 23

Figura 6. Cultivos triplicados en condiciones óptimas de crecimiento de las especies ictiotóxicas a) *Heterosigma akashiwo* (15°C 20 psu) y b) *Pseudochattonella verruculosa* (18°C y 30 psu)..... 24

Figura 7. Observación bajo microscopio invertido (Olympus, CKX41SF5) a 4X de monocapa de la línea celular CHSE-214 a una concentración de 2.5×10^5 células mL^{-1} , sembradas en una placa de 96 pocillos.....	27
Figura 8. Ensayo MTT en microplaca de 96 pocillos. A) control positivo (H_2O_2). B) control negativo (medio de cultivo L1). C) blancos de reactivos. D) Tratamientos de exposición de <i>H. akashiwo</i>	29
Figura 9. Ensayo MTT en microplaca de 96 pocillos. A) control positivo (H_2O_2). B) control negativo (medio de cultivo L1). C) blancos de reactivos. D) Tratamientos de exposición con <i>P. verruculosa</i>	30
Figura 10. Crecimiento de <i>Heterosigma akashiwo</i> bajo tres combinaciones de temperatura (12, 15 y 18 °C) y salinidad (10, 20 y 30 psu). Valores promedios \pm D.E.....	32
Figura 11. Crecimiento de <i>Pseudochattonella verruculosa</i> bajo tres tratamientos de temperatura (12, 15 y 18 °C) y salinidad (10, 20 y 30 psu). Valores promedios \pm D.E.....	34
Figura 12. Viabilidad celular mediante ensayo MTT en líneas celulares de salmón Chinook (CHSE-214) expuestas durante 1 hora a tres tratamientos (células directas, sobrenadante y lisis celular) de <i>Heterosigma akashiwo</i> a cinco densidades celulares (20, 200, 2.000, 20.000 y 200.000 células mL^{-1}) en dos condiciones de cultivos, ambas a 15°C y salinidad (20 y 30 psu).....	35
Figura 13. Viabilidad celular mediante ensayo MTT en líneas celulares de salmón Chinook (CHSE-214) expuestas durante 1 hora a tres tratamientos (células directas, sobrenadante y lisis celular) de <i>Pseudochattonella verruculosa</i> a cinco densidades celulares (20, 200, 2.000, 20.000 y 200.000 células mL^{-1}) en una condición de cultivo (18°C y 30 psu).....	37

RESUMEN

Las Floraciones Algales Nocivas (FAN) de especies ictiotóxicas generan anualmente severos impactos socioeconómicos en la industria de la salmonicultura chilena, lo que contrasta significativamente con los grandes vacíos de conocimiento sobre aspectos básicos de fisiología, ecología y mecanismos de acción de estas microalgas. En este contexto, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto combinado de la temperatura y salinidad sobre los cambios fisiológicos de dos especies ictiotóxicas chilenas: *Heterosigma akashiwo* y *Pseudochattonella verruculosa*. Para llevar a cabo este estudio, se elaboró una batería de combinaciones de temperatura (12, 15 y 18 °C) y salinidad (10, 20 y 30 psu) con la finalidad de establecer las condiciones óptimas de crecimiento. Establecidas estas condiciones, se realizaron ensayos de citotoxicidad en líneas celulares CHSE -214, mediante el método *in vitro* MTT. Se evaluó la actividad citotóxica de ambas especies en tres tratamientos de exposición (directa, sobrenadante y lisis celular), utilizando cinco densidades celulares entre 20 y 200.000 células mL⁻¹. Los resultados evidenciaron que ambas especies requieren diferentes condiciones ambientales para su óptimo crecimiento. La tasa máxima de crecimiento de *H. akashiwo* fue 0.99 div. día⁻¹ a 15°C y 20 psu. Mientras, *P. verruculosa* alcanzó una tasa máxima de crecimiento de 1.06 div día⁻¹ a 18°C y 30 psu. A su vez, *H. akashiwo* generó toxicidad en todos los tratamientos de exposición, alcanzando un 100% de reducción de la viabilidad celular en los tratamientos de exposición directa. Por otra parte, *P. verruculosa* evidenció menor toxicidad, generando una disminución de la viabilidad celular en un 39% en los tratamientos de exposición a sobrenadante. En términos generales, la liberación del contenido intracelular puede señalarse como la parte más ictiotóxica de *P. verruculosa*, mientras que *H. akashiwo* tiene una porción más lítica cuando las células están en contacto directo con las líneas CHSE-214. Estos resultados demostraron la importancia del efecto combinado de la temperatura y salinidad sobre el crecimiento y el potencial ictiotóxico de ambas especies, los cuales generan ictiotoxicidad en ciertas condiciones de crecimiento. Finalmente, estos resultados pueden ayudar a la creación de un mapa de riesgo de la industria salmonicultora frente a eventos generados por estas dos especies ictiotóxicas en función de las características oceanográficas de cada sitio.

ABSTRACT

Harmful Algae Blooms (HAB) of ichthyotoxic species annually generate severe socio-economic impacts on the Chilean salmon farming industry, which contrasts significantly with the major gaps in knowledge concerning the basic aspects of physiology, ecology and mechanisms of action of these microalgae. In this context, the aim of this work was to evaluate the combined effect of temperature and salinity on the physiological changes in two Chilean ichthyotoxic species: *Heterosigma akashiwo* and *Pseudochattonella verruculosa*. To conduct this study, a battery of temperature (12, 15 and 18 °C) and salinity (10, 20 and 30 psu) combinations was elaborated in order to establish optimal growth conditions. Once these conditions were established, cytotoxicity tests were conducted on CHSE-214 cell lines, using the *in vitro* MTT method. The cytotoxicity of both species was evaluated in three exposure treatments (direct, supernatant and cell lysis), employing five cell densities between 20 and 200,000 cells mL⁻¹. The results revealed that both species require different environmental conditions for their optimal growth. The maximum growth rate of *H. akashiwo* was 0.99 div. day⁻¹ at 15 °C and 20 psu. While, *P. verruculosa* reached a maximum growth rate of 1.06 div. day⁻¹ at 18 °C and 30 psu. Likewise, *H. akashiwo* generated toxicity in all exposure treatments, reaching 100% cell viability reduction in direct exposure treatments. On the other hand, *P. verruculosa* evidenced less toxicity, generating a 39% reduction in cell viability in supernatant exposure treatments. Overall, the release of the intracellular content can be indicated as the most ichthyotoxic part of *P. verruculosa*, while *H. akashiwo* has a more lytic portion when the cells are in direct contact with CHSE-214 lines. These results prove the importance of the combined effect of temperature and salinity on growth and ichthyotoxic potential of both species, which generate ichthyotoxicity under certain growth conditions. Finally, these results can help in the creation of a risk map of the salmon farming industry against events caused by these two ichthyotoxic species depending on the oceanographic characteristics of each site.

1. INTRODUCCIÓN

Floraciones Algales Nocivas (FAN en adelante), es el término acuñado por la Comisión Oceanográfica Intergubernamental (COI) de la UNESCO para describir cualquier proliferación de microalgas, independientemente de su concentración, percibida como un daño por su impacto socio-económico (daños a la salud pública, bienes y servicios costeros). Esta definición socio-económica incluye floraciones de diversas especies de microalgas, entre las que se incluyen: i) Microalgas productoras de toxinas que se acumulan a través de las redes tróficas (incluyendo productores de toxinas emergentes); ii) Microalgas “asesinas de peces” (fish-killers); iii) Microalgas formadoras de floraciones de elevada biomasa (high-biomass HABs, HB-HAB) que sin ser tóxicas alteran las condiciones físico-químicas del medio; iv) Cianobacterias (Granéli et al. 1999) y v) Floraciones Nocivas de Microalgas Bentónicas (Benthic HABs, GEOHAB 2012). Las FANs de especies productoras de toxinas y las que provocan mortalidades en peces, representan la principal amenaza natural para la salud pública y la explotación de recurso pesqueros en Chile, entre ellos la salmonicultura. A pesar de que los impactos socio-económicos de ambos grupos de microalgas han sido muy severos, el principal foco de atención ha estado centrado en el estudio de las microalgas productoras de toxinas (Guzmán et al. 2002, Molinet et al. 2003, Díaz et al. 2019), por lo cual, el estudio de microalgas ictiotóxicas en Chile es bastante limitado.

En las tres últimas décadas se ha observado a nivel global un incremento aparente de eventos tóxicos, en parte justificado por el incremento paulatino de explotación de recursos costeros (acuicultura, actividades de ocio) y de un aumento exponencial de las observaciones a través de programas de seguimiento (Hallegraeff 1993, Anderson et al. 2008, Hallegraeff 2010). La expansión e impacto creciente de las FAN, con mayor duración y nuevas áreas afectadas en las últimas décadas ya fue destacado por FAO en 2004 en su “Estudio de Alimentación y Nutrición sobre Biotoxinas Marinas” (FAO 2004). Al igual que la tendencia observada a nivel global, las FAN en la región sur austral de Chile (fiordos patagónicos) han sido un problema recurrente durante las últimas décadas (Guzmán et al. 1975, Guzmán et al. 2002, Díaz et al. 2019), incluyendo eventos de gran magnitud e impactos severos que han afectado a la industria de la salmonicultura (Clément et al. 2016, León-Muñoz et al. 2018).

Los eventos de FAN observados en Chile en las últimas cuatro décadas han tomado mayor interés mediático debido al impacto negativo que ejerce sobre la producción acuícola y la extracción de mariscos desde bancos naturales. En vista del gran impacto que generan las FAN sobre el ecosistema y la salud humana, el gobierno central a través del Ministerio de Salud (MINSAL), implementaron un plan estratégico permanente de monitoreo denominado “Programa Nacional de Vigilancia de Fenómenos Algales Nocivos”, con el objetivo de minimizar el riesgo de la población por consumir mariscos contaminados, detectando oportunamente los niveles de toxinas en los productos del mar, conociendo la magnitud y evolución del fenómeno, como también realizar actividades de vigilancia y control (MINSAL 2008). Las principales especies causantes de FAN son dinoflagelados productores de toxinas, entre ellos destacan los géneros *Alexandrium*, *Dinophysis*, *Protoceratium*, *Prorocentrum* y *Gymnodinium*. También existen otros grupos productores de toxinas como diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* y fitoflagelados pertenecientes a la división Heterokontophyta, donde las especies *Heterosigma akashiwo* (clase Raphidophyceae) y *Pseudochattonella verruculosa* (clase Dictiochophyceae), destacan como principales especies ictiotóxicas en Chile (Díaz et al. 2019).

Dentro de las raphidofíceae, existe un grupo de microalgas que se les relaciona con mortalidades masivas de peces en cultivo y silvestres (Imai & Yamaguchi 2012). Algunas de las especies que componen esta clase son *Chattonella marina*, *Fibrocapsa japónica* y *Heterosigma akashiwo* (Rensel 2007). En particular, *H. akashiwo* forman FAN generando compuestos que pueden ser tóxicos para los peces, ocasionándoles la muerte y generando grandes pérdidas económicas para el sector acuícola (Nakamura et al. 1998). Sus características morfológicas son variables, cuentan con dos flagelos, uno más largo que el otro (anterior), el cual genera el movimiento y desplazamiento de la célula, mientras que el más corto (posterior) es rígido y está apegado al cuerpo, siendo difícil de observar al microscopio (Guiry & Guiry 2020). Pueden adoptar diferentes formas (ovoides, elongadas, piriformes y esféricas pequeñas), las cuales dependerá de las condiciones ambientales o de cultivo en las que se encuentren. Su coloración es café-amarillo y su tamaño varía entre 5 a 25 μm , similar a microalgas del género *Pseudochattonella*.

El género *Pseudochattonella* se caracteriza por ser uno de los grupos responsables de mortalidades masivas de peces, inicialmente se identificó como *Chattonella* aff. *verruculosa*

perteneciente al grupo de las Raphidophyceae (Hara et al. 1994), pero un estudio a nivel molecular de Hosoi-Tanabe et al. (2007) reveló su parentesco con las Dictyochophyceae mediante un análisis filogenético de la región 18S, por lo que surgió un nuevo género denominado *Pseudochattonella*, clasificándose esta especie ictiotóxica como *Pseudochattonella verruculosa*. La morfología de *P. verruculosa* es muy variable y su forma depende de las condiciones de crecimiento. Sus tamaños varían entre 7 a 27 μm (fase vegetativa), con contornos irregulares y diferentes formas (alargadas y grandes, esféricas pequeñas, células con hilos largos, entre otras), las que pueden cambiar constantemente adoptando dos a tres formas distintas en menos de 1 minuto (observación personal). Poseen dos flagelos desiguales (Heterocont), uno largo, el más visible bajo microscopio y uno más corto, que por lo general no es visible bajo microscopio. En ocasiones se puede observar una protuberancia en la base del flagelo más largo. En su superficie se observan numerosos organelos llamados mucocistos, que sobresalen y le otorgan una apariencia verrugosa. En algunos estudios se ha mencionado el potencial ictiotóxico que pueden tener los mucocistos y que, al descargar su contenido al medio, puede expulsar algún metabolito secundario capaz de causar toxicidad a otros organismos (Klöpffer et al. 2013). La coloración de esta microalga es verde-café con pequeñas tonalidades de amarillo. Posee un núcleo esférico central en la parte anterior de la célula. Durante la fase sexual pueden formar una especie de plasmodio de 200 μm , multinucleadas, que en su interior contienen múltiples células hijas, muy pequeñas (3 μm), estas son liberadas cuando se desintegra toda la membrana del plasmodio (Chang et al. 2014).

En los últimos años, las microalgas ictiotóxicas presentes en Chile y que mayores impactos han generado en la industria salmonicultora corresponden a: *Alexandrium catenella*, *Heterosigma akashiwo* y *Pseudochattonella verruculosa*. En el caso de *A. catenella* existen numerosos estudios en Chile asociados a su fisiología (Aguilera-Belmonte et al. 2013), producción de toxinas y caracterización genética (Aguilera-Belmonte et al. 2011, Varela et al. 2012) y efectos ictiotóxicos (Mardones et al. 2015), entre otros. Sin embargo, en el caso de *H. akashiwo* y *P. verruculosa* el conocimiento es muy limitado. Lo anterior contrasta drásticamente con los impactos generados por ambas especies en la industria salmonicultora durante las últimas décadas. Un ejemplo de esto lo constituye el primer evento FAN en Chile causado por *H. akashiwo* hace más de tres décadas (septiembre de 1988), el cual generó

dramáticas consecuencias económicas para la industria, pérdidas cercanas a los 11 millones de dólares (Avaria et al. 1999) y la pérdida del 50% de la producción nacional de ese año (10,000 t). Sin embargo, el evento más reciente y con los impactos más severos ocurrió en verano de 2016, asociado a una intensa floración de *P. verruculosa* que afectó a 45 centros de cultivo en la zona del fiordo y seno de Reloncaví, región de Los Lagos (Clément et al. 2016, León-Muñoz et al. 2018). Este evento ocasionó la mortalidad de 39.942 toneladas de salmones, equivalentes a 27 millones de peces y pérdidas económicas cercanas a 800 millones de dólares (Díaz et al. 2019). La floración de 2016, a pesar de ser extrema en intensidad e impacto socio-económicos, no es un evento aislado en el sistema Patagónico del sur de Chile, donde se concentra más del 99% de la industria salmonicultora. Floraciones de *P. verruculosa* han sido registradas en Chile desde el año 2004 (Mardones et al. 2012), aunque no con la intensidad de 2016.

El evento FAN de 2016 producido por *P. verruculosa*, se originó bajo condiciones ambientales excepcionales, caracterizadas por déficit de precipitación, aumento de la temperatura superficial del mar, elevada radiación solar y disminución del viento, entre otras (Garreaud 2018, León-Muñoz et al. 2018). Lo anterior, generó la estratificación de la columna de agua otorgando un ambiente óptimo para la proliferación de las microalgas, especialmente de *P. verruculosa* (Clément et al. 2016). Sin embargo, las investigaciones científicas llevadas a cabo hasta el momento no han especificado cual o cuales son los factores que originan la ictiotóxicidad de especies como *Pseudochattonella*. El foco de los estudios se ha centrado en su distribución geográfica, impacto ecológico y condiciones de cultivo estándar, los cuales no abordan el efecto combinado de la temperatura y salinidad en cultivos de microalgas de este tipo y cómo estos factores abióticos influyen en la ictiotoxicidad. Andersen et al. (2015) sugirieron que los experimentos de laboratorio para estudiar la ictiotoxicidad de *Pseudochattonella* deberían apuntar a establecer las condiciones óptimas de cultivo, con el fin de incrementar el conocimiento y ofrecer un modelo preventivo frente a floraciones de esta especie. En este sentido, parece apropiado plantear en detalle el desarrollo de cultivos bajo condiciones controladas, enfocando los esfuerzos en dos factores importantes; temperatura y salinidad, ya que estudios previos reportaron condiciones meteorológicas anómalas durante floraciones de ambas especies y bajo condiciones oceanográficas determinadas.

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto combinado de la temperatura y salinidad sobre los cambios fisiológicos de las especies ictiotóxicas *Heterosigma akashiwo* y *Pseudochattonella verruculosa*. Inicialmente, se determinaron las condiciones óptimas de crecimiento, relativas a las variables temperatura y salinidad, para posteriormente evaluar su ictiotóxicidad en líneas celulares de salmón Chinook (CHSE-214).



1.1. HIPÓTESIS

El efecto combinado de la temperatura y salinidad afecta los cambios fisiológicos de las especies ictiotóxicas *Heterosigma akashiwo* y *Pseudochattonella verruculosa*.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto combinado de temperatura y salinidad sobre los cambios fisiológicos de las especies ictiotóxicas *Heterosigma akashiwo* y *Pseudochattonella verruculosa* y su ictiotoxicidad bajo condiciones controladas.



1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Determinar las condiciones óptimas de crecimiento, en términos de temperatura y salinidad, para las especies ictiotóxicas *Heterosigma akashiwo* y *Pseudochattonella verruculosa*.
- II. Evaluar y cuantificar la ictiotoxicidad de ambas especies microalgales en la línea celular CHSE 214.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. ORIGEN DE LAS CEPAS

Las cepas de *Heterosigma akashiwo* (Fig. 1) y *Pseudochattonella verruculosa* (Fig. 2) utilizadas en este estudio fueron aisladas de floraciones recientes registradas en la X región de Los Lagos. La cepa *H. akashiwo* fue obtenida desde la costa de Maullín (41°37'S; 73°36'W) durante una floración registrada en abril de 2013. Mientras, la cepa *P. verruculosa* fue obtenida en el fiordo de Reloncaví durante una floración intensa registrada en verano de 2016 (Fig. 3).

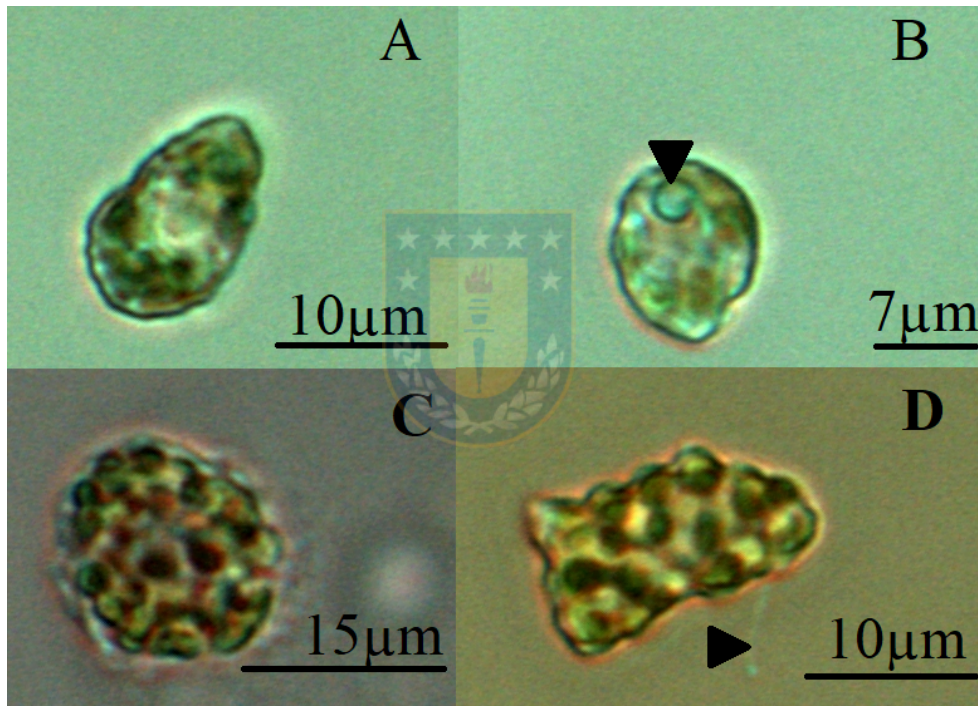


Figura 1. Micrografías de células de *Heterosigma akashiwo* obtenidas desde cultivos monoalgales y observadas bajo microscopio invertido a 40X. A) Célula piriforme; B) Célula vegetativa pequeña con núcleo conformado (punta de flecha). C) Célula vegetativa en forma de “mora” por efecto del aumento de luz. D) Célula vegetativa con flagelo más largo (punta de flecha).

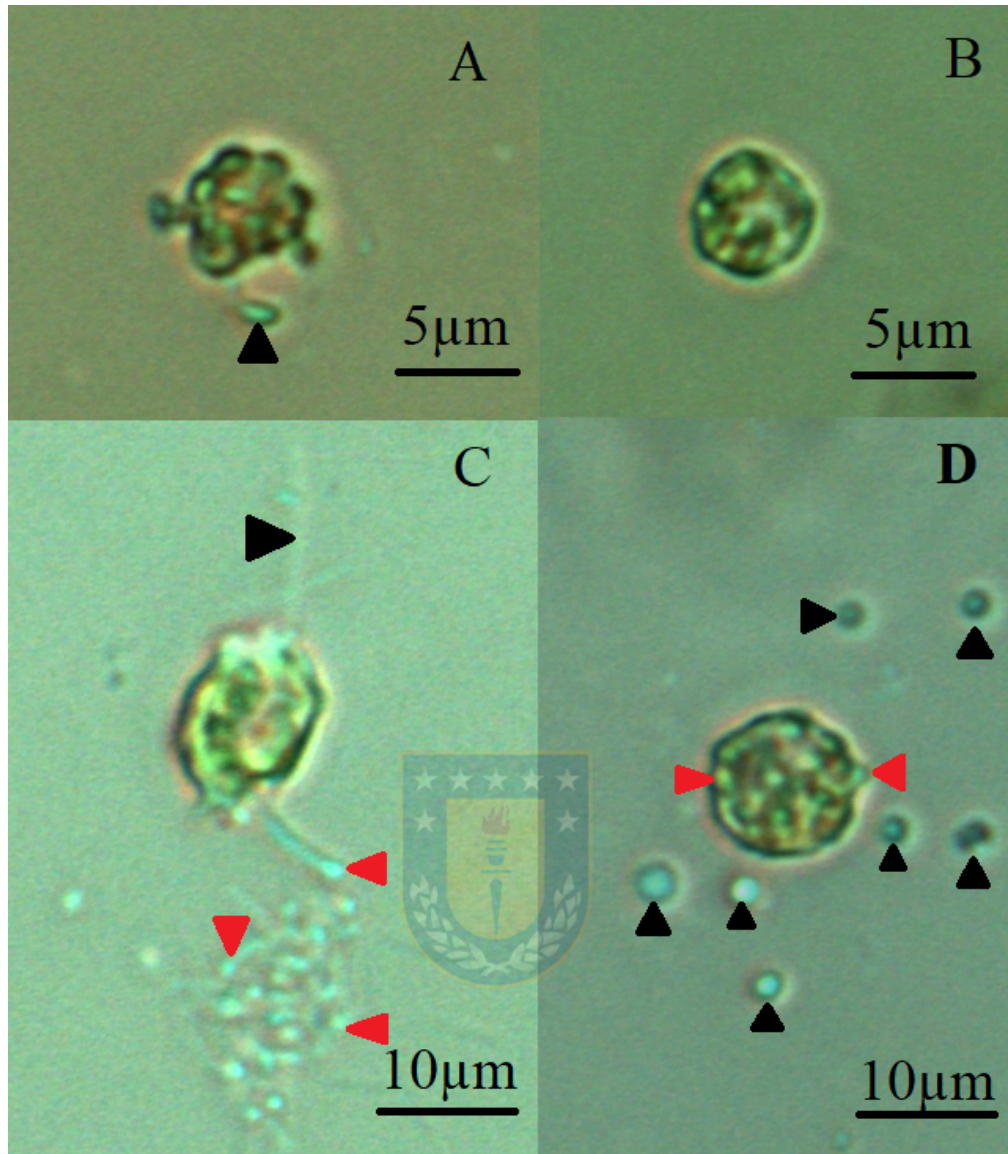


Figura 2. Micrografías de células de *Pseudochattonella verruculosa* obtenidas desde cultivos monoalgales y observadas bajo microscopio invertido a 40X. A) Célula vegetativa con una protuberancia en la base del flagelo (punta de flecha); B) Célula vegetativa con forma esférica pequeña; C) Célula vegetativa con flagelo largo (punta de flecha negra) y eyecciones de los mucocistos (punta de flechas rojas); D) Célula vegetativa redonda con mucocistos en la periferia de la célula (punta de flechas rojas), acompañadas de células hijas (punta de flechas negras).

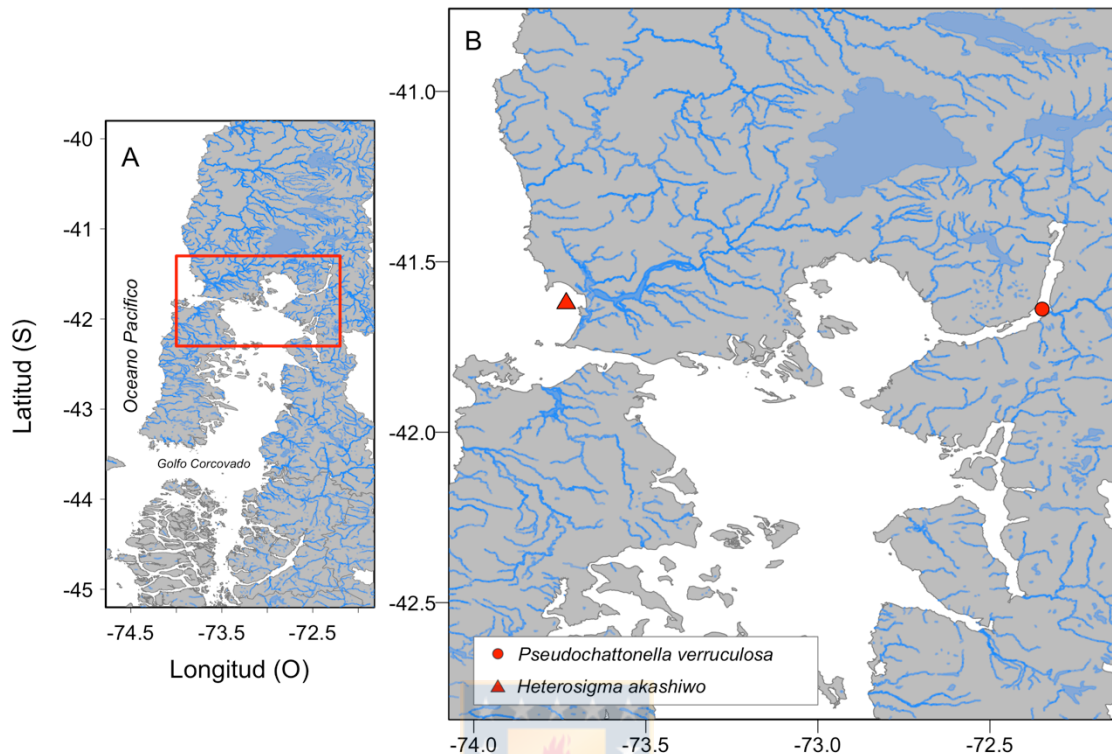


Figura 3. A) Mapa del sur de Chile mostrando el mar interior de las regiones de Los Lagos y Aysén; B) Zonas de obtención de cepas *Heterosigma akashiwo* y *Pseudochattonella verruculosa* durante floraciones registradas en los años 2013 y 2016, respectivamente.

2.2. AISLAMIENTO DE LAS CEPAS

Las cepas fueron aisladas en el Laboratorio de Biología del Centro de Investigación y Desarrollo de Recursos y Ambientes Costeros i~mar ubicado en Puerto Montt, a través de subcultivos repetidos en tubos de ensayo de 15 mL hasta alcanzar cultivos unialgales, mantenidos en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio de cultivo L1 (Guillard & Hargraves 1993) en condiciones controladas de temperatura 12 ± 1 °C, salinidad 34 ± 1 psu, irradiancia ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) y fotoperiodo (14:10) (L:O).

2.3. CONDICIONES DE CULTIVO Y PRE-ACLIMATACIÓN

Aisladas las cepas, se mantuvieron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio L1, inoculados con $1.000 \text{ células mL}^{-1}$ en condiciones controladas de temperatura ($12 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$), salinidad ($34 \pm 1 \text{ psu}$), irradiancia ($50 \mu\text{mol/m}^2 \text{ s}^{-1}$) y fotoperiodo (14:10) (L:O). Los recuentos se realizaron diariamente en cámara Sedgewick-Rafter de 1 mL bajo un microscopio invertido (Olympus, CKX41). Para facilitar los recuentos, las muestras fueron fijadas con Lugol al 10%. Cada 3 días se incorporaban 6 mL de medio L1 fresco debido a la extracción diaria de 2 mL de muestra y evaporación natural del cultivo. Durante la fase exponencial se extrajeron alícuotas que contenía $1.000 \text{ células mL}^{-1}$ para inocular nuevos matraces. La pre-aclimatación de los cultivos se realizó durante un mes.

2.4. ACLIMATACIÓN DE LAS CEPAS

Las cepas fueron aclimatadas a nuevas condiciones de cultivo para lo cual se prepararon medios de cultivo L1 a diferentes salinidades (10, 20 y 30 psu). La salinidad se ajustó de acuerdo con el protocolo de Yamaguchi et al. (1997), mientras que la temperatura fue ajustada a (12, 15 y 18°C) en cámaras de cultivos aclimatadas, irradiancia ($50 \mu\text{mol/m}^2 \text{ s}^{-1}$) y fotoperiodo (14:10) (L:O) (Fig. 4). Como variable de experimentación, se evaluaron combinaciones de tres salinidades y tres temperaturas para cada microalga, todas en triplicado (Fig. 5). En matraces Erlenmeyer estériles de 250 mL con 100 mL de medio L1 ajustadas a las condiciones de temperatura y salinidad objetivo, se inocularon $1.000 \text{ células mL}^{-1}$. Diariamente se tomaron alícuotas de 2 mL para cada una de las tres réplicas, se fijaron con Lugol al 10% y se realizaron los conteos en cámara Sedgewick-Rafter de 1 mL bajo microscopio invertido (Olympus, CKX41). Cada 3 días se incorporaron 6 mL de medio L1 fresco. Los recuentos se realizaron hasta que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria (15 días). Cada resiembra se realizó en la fase exponencial de los cultivos, ya que en esta fase las cepas se han adaptado a las condiciones de crecimiento. La aclimatación de los cultivos se llevó a cabo durante 2 meses.



Figura 4. Cámara de aclimatación con cultivos de las especies ictiotóxicas *Heterosigma akashiwo* y *Pseudochattonella verruculosa* a 15°C y distintas combinaciones de salinidades (10, 20 y 30 spu).













Salinidad Temperatura	10 PSU	20 PSU	30 PSU
12 °C 			
15 °C 			
18 °C 			

Figura 5. Batería de combinaciones de temperatura y salinidad utilizadas determinar la condición óptima de crecimiento de *Heterosigma akashiwo* y *Pseudochattonella verruculosa*. El número de matraces en cada combinación denota el número de replicas utilizadas.

2.5. CURVAS DE CRECIMIENTO

Los cultivos se iniciaron con $1.000 \text{ células mL}^{-1}$, previamente aclimatadas a cada condición de cultivo. Se establecieron tres réplicas para cada tratamiento (Fig. 6). Los recuentos se realizaron diariamente en cámara de Sedgewick-Rafter durante 15 días.

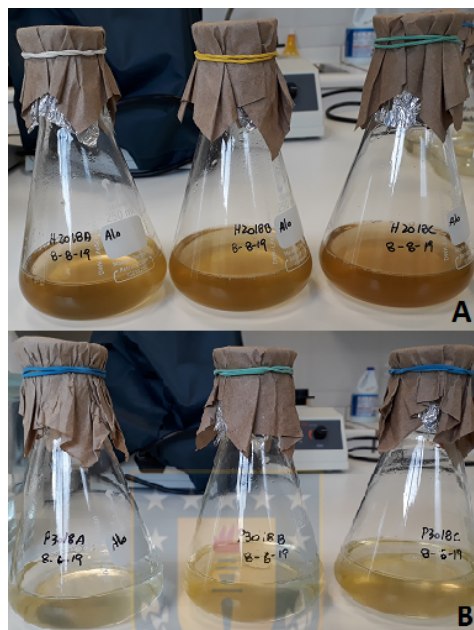


Figura 6. Cultivos triplicados en condiciones óptimas de crecimiento de las especies ictiotóxicas: A) *Heterosigma akashiwo* (15°C ; 20 psu); B) *Pseudochattonella verruculosa* (18°C ; 30 psu).

2.6. TASAS DE CRECIMIENTO

Luego de realizar las curvas de crecimiento definitivas, se calcularon las tasas de crecimiento k (duplicación de biomasa día⁻¹) según Guillard (1973), la cual fue estimada durante la fase de crecimiento exponencial, para cada una de las muestras, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$k = \frac{3.322}{t_2 - t_1} \times \log \frac{N_2}{N_1}$$

Donde:

t = tiempo en días

N = densidad celular en el cultivo

Subíndices = valores a diferentes tiempos

2.7. DETERMINACIÓN DE LA CONDICIÓN ÓPTIMA DE CRECIMIENTO

La condición óptima de crecimiento, en términos de temperatura y salinidad, se determinó mediante el cálculo de las tasas máximas de crecimiento (k) alcanzadas durante la fase de crecimiento exponencial para cada una de las dos especies.

2.8. TRATAMIENTO DE EXPOSICIÓN DE MICROALGAS

Una vez establecidas las condiciones óptimas de crecimiento, en términos de temperatura y salinidad, se establecieron los siguientes tratamientos de exposición (exposición directa de microalgas, sobrenadante y lisis celular) a diferentes densidades celulares (20, 200, 2.000, 20.000 y 200.000 células mL⁻¹).

- a) Exposición directa con microalgas: una vez calculada la densidad celular de la especie, se preparó una batería de cinco tubos Falcon de 15 mL. Uno de los tubos contenía una solución madre de 200.000 células mL⁻¹ en un volumen final en 10 mL. De esta manera, se logró realizar diluciones seriadas extrayendo 1 mL de la solución madre, diluyéndola en 9 mL de medio L1 hasta alcanzar la densidad celular más baja establecida (20 células mL⁻¹).
- b) Sobrenadante: una vez calculada la densidad celular de la especie, se preparó una batería de cinco tubos de ensayo de vidrio de 15 mL, uno de los tubos contenía una solución madre de 200.000 células mL⁻¹ la cual fue filtrada con un filtro de jeringa de nylon (0.22 μm). Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas extrayendo 1 mL

desde la solución madre, diluyéndola en 9 mL de medio L1 hasta alcanzar la densidad celular más baja establecida (20 células mL⁻¹).

- c) Lisis celular: calculada la densidad celular de la especie, se preparó una batería de cinco tubos falcon de 15 mL, uno de los tubos contenía una solución madre de 200.000 células mL⁻¹ la cual fue lisada por centrifugación a 4.000 rpm por 10 min. Posteriormente y al igual que en los dos casos anteriores, se realizaron diluciones seriadas extrayendo 1 mL desde la solución madre y diluyéndola en 9 mL de medio L1, hasta alcanzar la densidad celular más baja establecida (20 células mL⁻¹).

2.9. CRECIMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR CHSE-214

La línea celular CHSE-214 (Fig. 7), fue proporcionada por el Laboratorio de Biotecnología de Fundación Chile / Fraunhofer Chile ubicado en el Centro Acuícola Quillaipe de Fundación Chile, Puerto Montt. La línea celular adherente fue adquirida en ECACC (Collection of Authenticated Cell Cultures, número de catálogo 91041114) y se deriva de embrión de salmón Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*). Esta línea es utilizada en numerosos estudios que abarcan campos como la virología y toxicología (Davoren et al. 2005). La preparación de todos los cultivos y microplacas utilizadas con la línea celular CHSE-214 se realizó en el interior del gabinete de bioseguridad (NuAire, NU425-400E). El crecimiento y preparación rutinario de las células se realizó en frascos de cultivo celular de 25 cm² (353014, Falcon®) con medio L15 Leibovitz con L-glutamina (10-045-CVR, Corning®) suplementado con suero fetal bovino 10% v/v (16000-044, Gibco®) y antibióticos 10.000 UI de penicilina / estreptomina (30-002-CI, Corning®). Las monocapas adherentes se desprendieron de la superficie del frasco para generar subcultivos con la utilización de tripsina 0,25%, 2.21 mM EDTA (25-053-CI, Corning®). Las células fueron incubadas en oscuridad a 20°C ± 1°C en un incubador refrigerado (Velp Scientifica Modelo FTC90E).

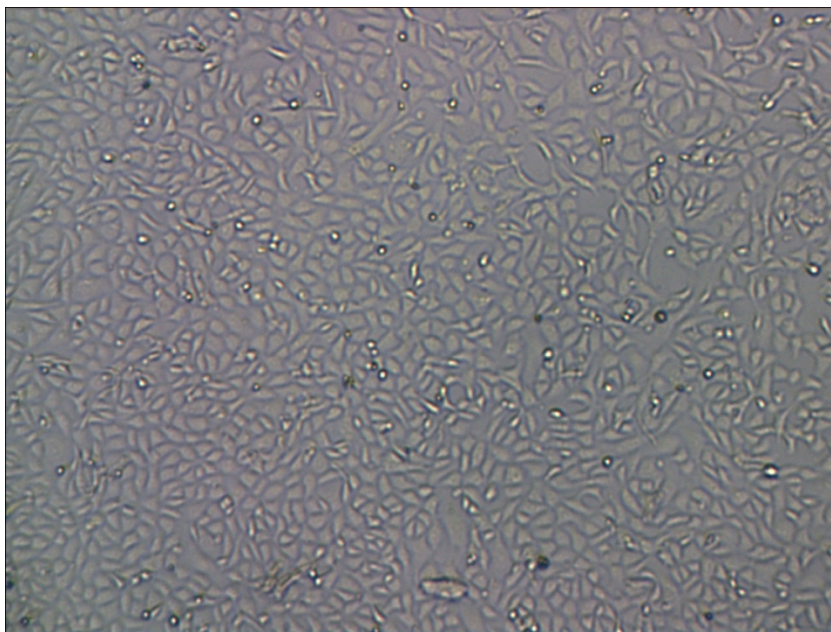


Figura 7. Observación bajo microscopio invertido (Olympus, CKX41SF5) a 4X de monocapa de la línea celular CHSE-214 a una concentración de 2.5×10^5 células mL^{-1} , sembradas en una placa de 96 pocillos.

2.10. PREPARACIÓN DE MICROPLACAS CON LÍNEA CELULAR CHSE-214

Las microplacas de 96 pocillos, de baja evaporación, fondo plano, no tratadas (3370, Costar® Corning®) se prepararon 48 horas antes de ser utilizadas, con 5.0×10^4 células/pocillo. La monocapa de cultivo se desprendió del frasco de cultivo y se extrajo una alícuota para determinar su concentración celular por medio de conteo en cámara Neubauer observando bajo un microscopio invertido (Olympus, CKX41SF5). Obtenida la concentración de la suspensión preparada, se ajustó a una concentración de 2.5×10^5 células mL^{-1} y se sembró 200 μL de suspensión celular en cada pocillo utilizando una micropipeta multicanal.

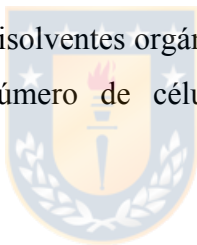
2.11. CONTEO CELULAR MEDIANTE HEMOCITÓMETRO

La alícuota (~ 0.5 mL) de suspensión celular se extrajo en un tubo de microcentrífuga de 1.7 mL (1740, Sorenson BioScience, Inc.), quedando el frasco en el gabinete a la espera de la estimación del número de células mL^{-1} . Se utilizó la tinción de azul de tripano para facilitar

el conteo e identificar las células vivas de las muertas. El azul de tripano es una tinción selectiva utilizada como método de viabilidad celular. Las células muertas absorben el tinte azul, mientras que las células vivas permanecen incoloras. Se mezcló desde el tubo de microcentrífuga un volumen de 100 μL de suspensión celular y 100 μL de una solución de azul de tripano (15250-061, Gibco®). Se homogenizó y se cargó 12 μL con una micropipeta en ambas cuadrículas del hemocitómetro (cámara Neubauer). Sólo se contaron las células vivas para el cálculo de concentración celular de la suspensión.

2.12. ENSAYO MTT

El ensayo MTT (Metil Tiazol Tetrazolio) o también llamado test de inhibición de succinato deshidrogenasa (SDI), es un ensayo que mide la actividad metabólica de las células y se basa en la rotura del anillo de tetrazolio del MTT por diferentes deshidrogenasas mitocondriales, formando cristales de formazán. Los cristales de formazán son insolubles en agua, pero pueden solubilizarse con disolventes orgánicos. La cantidad de formazán generado, es directamente proporcional al número de células viables (metabólicamente activas) (Mosmann 1983).



2.13. DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE MTT

Transcurridas 48 horas de incubación a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, dentro del gabinete de bioseguridad, se descartó el medio de la microplaca por inversión suave. Se agregó 100 μL /pocillo, en cuadruplicado, de cada tratamiento de exposición de microalgas establecidas en 2.8 (a, b y c) a las diferentes densidades celulares (20, 200, 2.000, 20.000 y 200.000 células ml^{-1}). Se agregó 100 μL /pocillo en cuadruplicado de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 7.8 mM como control positivo (control de daño celular) y 100 μL /pocillo en cuadruplicado de medio de cultivo L1 utilizado en el crecimiento de las microalgas como control negativo de daño celular (control de daño celular). El tiempo de exposición de tratamientos y controles fue de 1 hora. Terminado el tiempo de contacto de los distintos tratamientos, se removió el contenido de la microplaca por inversión y se agregó 100 μL de MEM (Medio modificado de Eagle con glutamina, bicarbonato de sodio y sin rojo fenol 11935-046, Gibco®) y 10 μL de reactivo

MTT (Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit V-13154, Invitrogen) preparado a una concentración de 5 mg mL^{-1} a cada pocillo, se incubó la microplaca por 3 horas a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ en oscuridad utilizando un incubador refrigerado. Transcurrida 3 horas de contacto con MTT, se adicionó $100 \text{ }\mu\text{L}$ de solución SDS-HCl (Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit V-13154, Invitrogen) a cada pocillo y se incubó durante toda la noche a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ en oscuridad en el incubador refrigerado. Adicionalmente, se dejaron pocillos vacíos (sin monocapa celular) a los que se les agregó sólo los reactivos (MEM, MTT, SDS-HCl) los que fueron usados como blanco de reactivos en el ajuste de la medición de absorbancia de los pocillos tratados y control negativo de daño y control de crecimiento (Figs. 8 y 9).

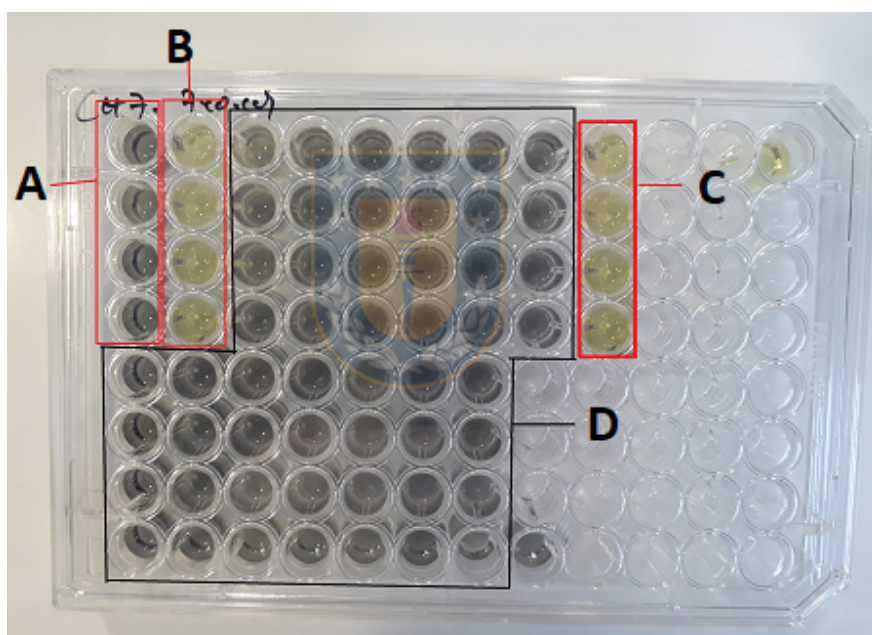


Figura 8. Ensayo MTT en microplaca de 96 pocillos. A) control positivo (H_2O_2). B) control negativo (medio de cultivo L1). C) blancos de reactivos. D) Tratamientos de exposición de *H. akashiwo*.

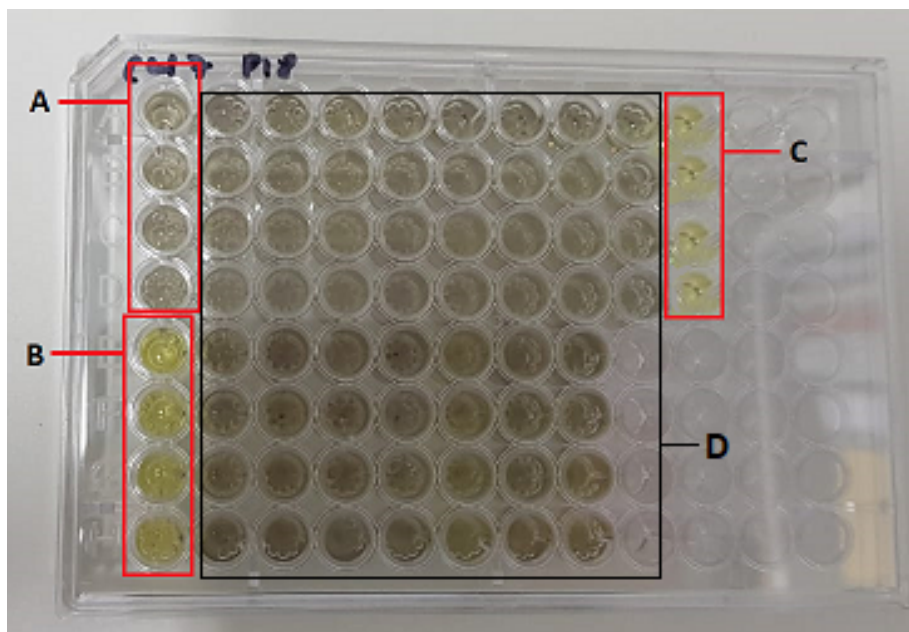


Figura 9. Ensayo MTT en microplaca de 96 pocillos. A) control positivo (H_2O_2). B) control negativo (medio de cultivo L1). C) blancos de reactivos. D) Tratamientos de exposición con *P. verruculosa*.

Finalmente, se registró la absorbancia en un lector de microplacas (Tecan, Infinite M200 Pro) a 570 nm. La viabilidad celular se expresó como porcentaje de células vivas, según la siguiente relación:

$$\% \frac{D.O \text{ tto}}{D.O \text{ c neg daño}} \times 100$$

Donde:

D.O tto: Es la densidad óptica ajustada de las células tratadas (D.O 570 nm tratamiento - D.O 570 nm blanco reactivo).

D.O c neg daño: Es la densidad óptica ajustada de las células control negativo de daño celular, expuestas sólo al medio L1 (D.O 570 nm control crecimiento - D.O 570 nm blanco reactivo).

3. RESULTADOS

3.1. PARÁMETROS DE CRECIMIENTO DE *H. akashiwo* y *P. verruculosa*

Heterosigma akashiwo evidenció un crecimiento exponencial en todas las combinaciones temperaturas y salinidades a las que fueron expuestas (Fig. 10). Las tasas de crecimiento máximas variaron entre 0.57 y 0.99 div día⁻¹, mientras las densidades celulares máximas fluctuaron entre 1.22 x 10⁵ y 3.09 x 10⁵ células mL⁻¹ (Tabla 1). Los valores más altos para ambos parámetros corresponden a los cultivos expuestos a 15°C y 20 psu, mientras los valores más bajos a los cultivos expuestos a 12°C y 10 psu (Tabla 1).

Las tasas de crecimiento fueron máximas a 20 psu en todas las temperaturas utilizadas fluctuando entre 0.67 y 0.99 div día⁻¹, mientras que las más bajas se observaron a 10 psu, igualmente en todas las temperaturas, excepto en los cultivos sometidos a 18°C, donde la tasa más baja se registró a 30 psu (0.80 div día⁻¹; Tabla 1).

Tabla 1. Tasas de crecimiento y densidades celulares máximas de *H. akashiwo* y *P. verruculosa* cultivadas bajo tres combinaciones de temperatura y salinidad. Los valores representan las medias ± desviación estándar de los recuentos celulares por triplicado.

Especie	Temperatura (°C)	Salinidad (psu)	Tasa de crecimiento (div día ⁻¹)	Densidad celular máxima (células mL ⁻¹)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	12	10	0,57 ± 0,005	122083 ± 3145
	12	20	0,67 ± 0,03	206666 ± 29615
	12	30	0,62 ± 0,02	192000 ± 43125
	15	10	0,73 ± 0,07	215833 ± 46255
	15	20	0,99 ± 0,08	253333 ± 7216
	15	30	0,79 ± 0,04	300000 ± 33071
	18	10	0,83 ± 0,11	266666 ± 21262
	18	20	0,85 ± 0,08	309166 ± 46255
	18	30	0,80 ± 0,07	309166 ± 46525
<i>Pseudochattonella verruculosa</i>	12	10	-	-
	12	20	0,47 ± 0,07	21250 ± 6717
	12	30	0,94 ± 0,11	265000 ± 21360
	15	10	-	-
	15	20	-	-
	15	30	0,97 ± 0,01	1015000 ± 205061
	18	10	-	-
	18	20	0,80 ± 0,03	43833 ± 9464
	18	30	1,06 ± 0,02	333750 ± 57800

Heterosigma akashiwo

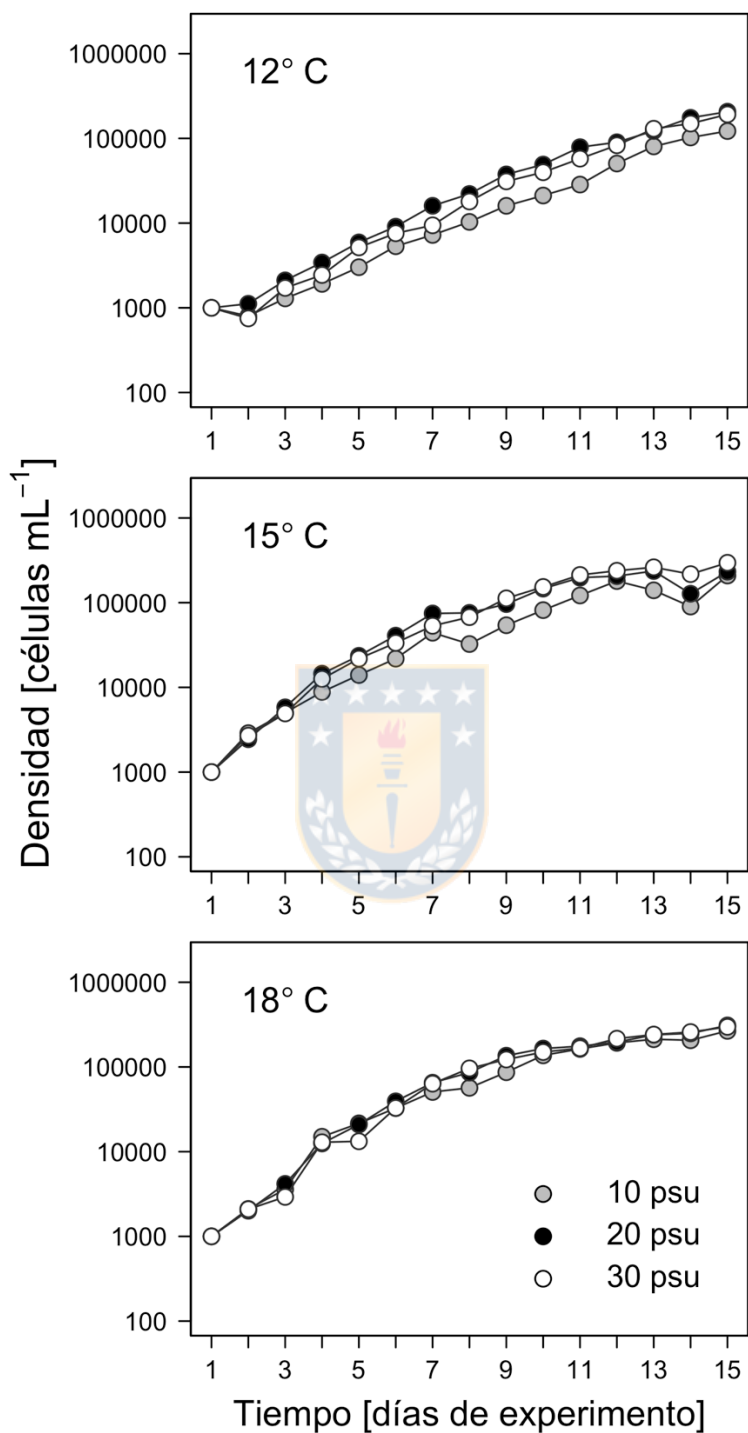


Figura 10. Crecimiento de *Heterosigma akashiwo* bajo tres combinaciones de temperatura (12, 15 y 18 °C) y salinidad (10, 20 y 30 psu). Valores promedios ± D.E.

A diferencia de *H. akashiwo*, *Pseudochattonella verruculosa* presentó un elevado crecimiento sólo a salinidades altas (30 psu), patrón que fue observado en las tres temperaturas utilizadas (Fig. 11). Las tasas de crecimiento máximas variaron entre 0.47 y 1.06 div día⁻¹, mientras las densidades celulares máximas fluctuaron entre 2.1x10⁴ a 1.015x10⁶ células mL⁻¹ (Tabla 1). La tasa de crecimiento máxima registrada corresponde a cultivos expuestos a 18°C y 30 psu (1.06 div día⁻¹), mientras que las densidades celulares máximas se obtuvieron a 15°C y 30 psu (1.015x10⁶ células mL⁻¹). En tanto, las tasas de crecimiento y densidad celular más bajas se obtuvieron a 12°C y 20 psu (Tabla 1). No se observó crecimiento en cultivos expuestos a 10 psu en ninguna de las tres temperaturas utilizadas (Fig. 11). Además, no se estimaron las tasas de crecimiento y densidades celulares máximas para los cultivos expuestos a 15°C y 20 psu, debido a que los valores estaban por debajo del inóculo (Fig. 11).

3.2. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ICTIOTÓXICO DE LA ESPECIE *H. akashiwo* EN LÍNEAS CELULARES DE SALMÓN CHINOOK (CHSE-214) A TRAVÉS DE ENSAYO MTT

La viabilidad de las líneas celulares CHSE-214 después de 1 hora de exposición a *H. akashiwo* mostró diferencias entre los distintos tratamientos. El tratamiento de exposición directa con microalgas resultó ser más tóxico a bajas densidades celulares (20 células mL⁻¹), reduciendo la viabilidad celular hasta en un 100% en la condición de salinidad más alta (30 psu), con respecto al control (Fig. 12A). El tratamiento con sobrenadante mostró una disminución de un 62% de la viabilidad celular a 30 psu, mientras que a 20 psu se observó una reducción de la viabilidad celular de un 45%, con respecto al control (Fig. 12B). Finalmente, el tratamiento de lisis celular mostró una disminución de un 56% en la viabilidad celular a 30 psu y una disminución de un 46% a 20 psu, con respecto al control (Fig. 12C).

Todos los tratamientos de exposición mostraron ser más tóxicos en la salinidad más alta utilizada (30 psu). Finalmente, la viabilidad celular no superó el 72% en todos los tratamientos de exposición en ambas salinidades (20 y 30 psu).

Pseudochattonella verruculosa

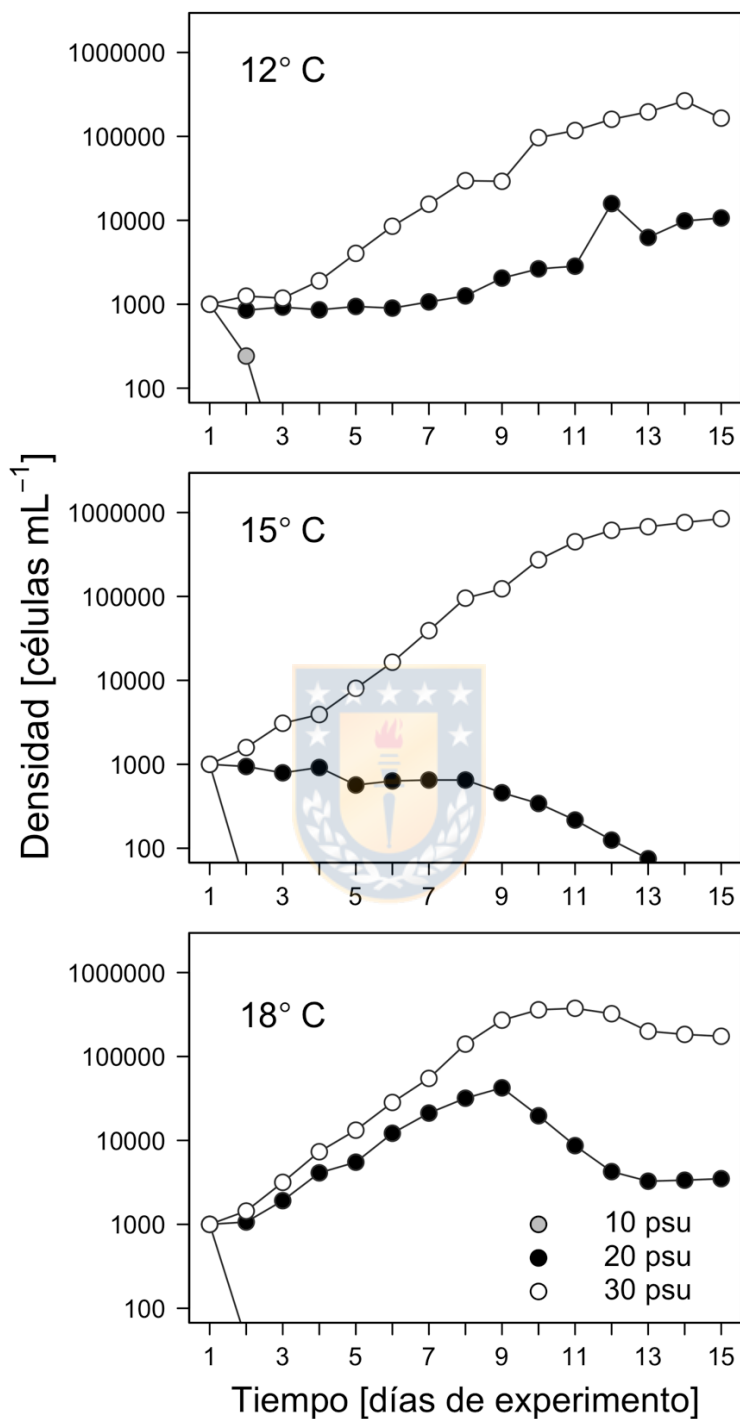


Figura 11. Crecimiento de *Pseudochattonella verruculosa* bajo tres tratamientos de temperatura (12, 15 y 18 °C) y salinidad (10, 20 y 30 psu). Valores promedios \pm D.E.

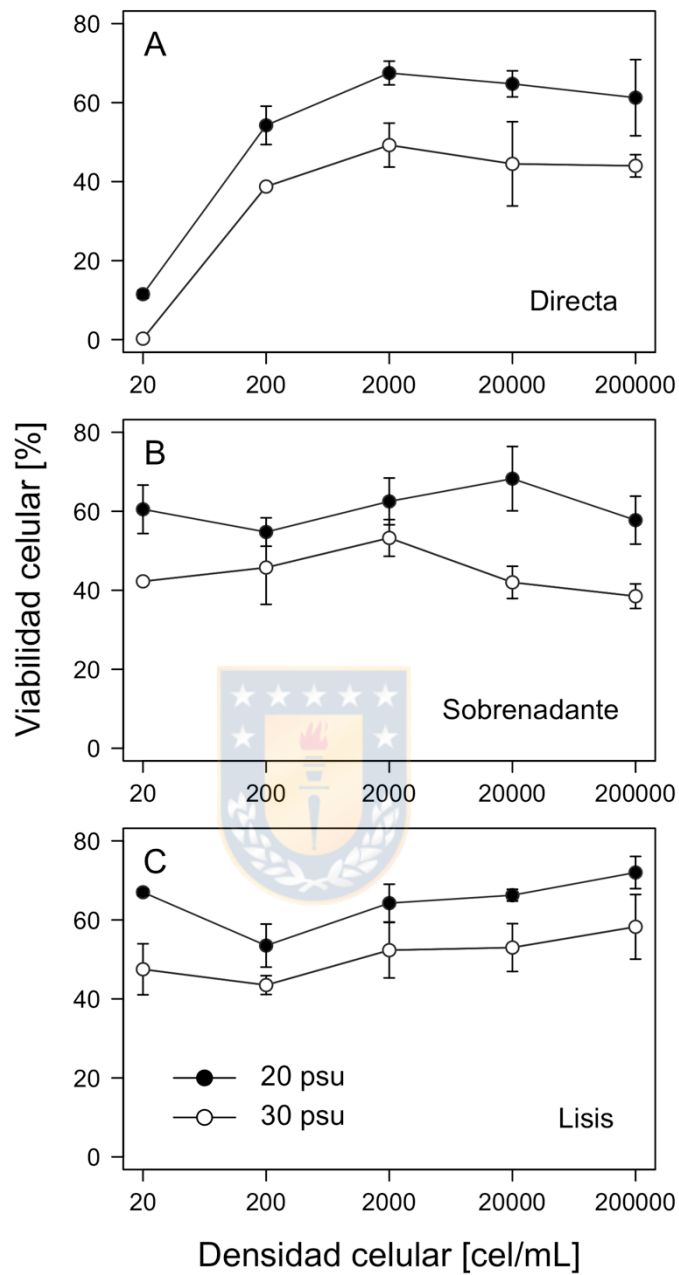


Figura 12. Viabilidad celular mediante ensayo MTT en líneas celulares de salmón Chinook (CHSE-214) expuestas durante 1 hora a tres tratamientos (células directas, sobrenadante y lisis celular) de *Heterosigma akashiwo* a cinco densidades celulares (20, 200, 2.000, 20.000 y 200.000 células mL⁻¹) en dos condiciones de cultivos, ambas a 15°C y salinidad (20 y 30 psu).

3.3. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ICTIOTÓXICO DE LA ESPECIE *P. verruculosa* EN LÍNEAS CELULARES DE SALMÓN CHINOOK (CHSE-214) A TRAVÉS DE ENSAYO MTT

La viabilidad de las líneas celulares CHSE-214 después de 1 hora de exposición a *P. verruculosa*, mantenidas en una condición de cultivo de 18°C y 30 psu, mostró diferencias entre los distintos tratamientos. El tratamiento de exposición directa con microalgas evidenció una disminución de la viabilidad celular en un 23% (Fig. 13A). Mientras, el efecto más significativo se observó en el tratamiento con sobrenadante, causando una disminución de la viabilidad celular de un 39%, con respecto al control (Fig. 13B). Finalmente, el tratamiento de lisis celular mostró una disminución en la viabilidad celular en un 28%, con respecto al control (Fig. 13C).

La viabilidad celular disminuyó conforme al aumento de la densidad celular en todos los tratamientos de exposición. Incluso a una densidad celular de 200.000 células mL⁻¹ de *P. verruculosa*, la viabilidad celular fue superior al 60%.



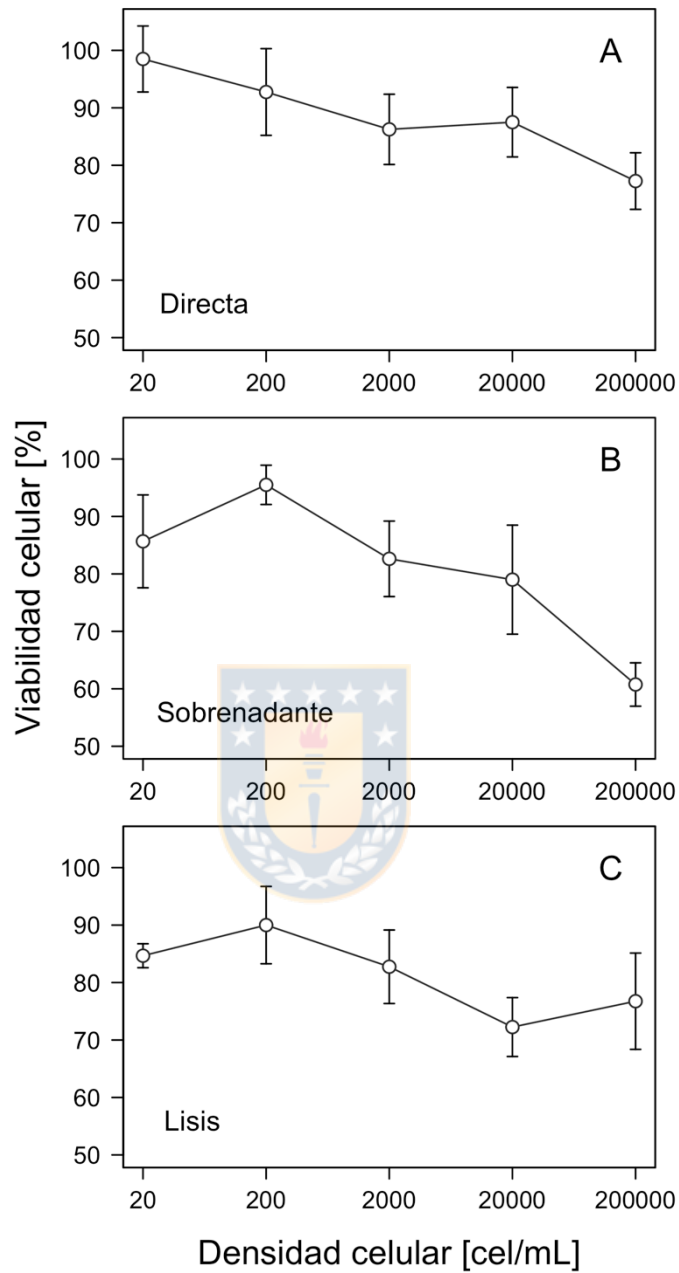


Figura 13. Viabilidad celular mediante ensayo MTT en líneas celulares de salmón Chinook (CHSE-214) expuestas durante 1 hora a tres tratamientos (células directas, sobrenadante y lisis celular) de *Pseudochattonella verruculosa* a cinco densidades celulares (20, 200, 2.000, 20.000 y 200.000 células mL⁻¹) en una condición de cultivo (18°C y 30 psu).

4. DISCUSIÓN

En las últimas décadas los eventos de FAN han sido cada vez más recurrentes e intensos debido a los cambios en las condiciones ambientales registrados en la región sur-austral de Chile, favoreciendo el crecimiento de especies microalgales como *H. akashiwo* y *P. verruculosa* y generando pérdidas económicas importantes para la industria salmonicultora debido a la mortalidad masiva de salmones (Díaz et al. 2019).

El fiordo y Seno de Reloncaví representa el límite norte del sistema de fiordos y canales Patagónicos, en el cual se desarrolla una parte importante de la salmonicultura nacional y que en los últimos años se ha visto severamente afectada por la recurrencia de eventos FAN (León-Muñoz et al. 2018, Díaz et al. 2019). Esta área se caracteriza por presentar un amplio rango de salinidad que puede variar desde valores inferiores a 10 psu en aguas superficiales y valores que superan los 30 psu en aguas más profundas. Las variaciones de salinidad en esta área está regulada principalmente por la entrada de agua dulce proveniente del río Puelo, cuyo flujo promedio anual es de $650 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ (Castillo et al. 2016, León-Muñoz et al. 2018) y un régimen de alimentación pluvionival caracterizado por lluvias y deshielo, alcanzando su flujo máximo en invierno, por las lluvias, y en primavera por los deshielos o nieve. De esta forma, el gran aporte de agua dulce al sistema produce una fuerte estratificación vertical de la columna de agua, la cual limita el intercambio de nutrientes entre la capa superficial (principalmente proveniente de ríos) y la capa profunda (de origen oceánicas) rica en nutrientes (Silva et al. 1995, León-Muñoz et al. 2018).

En el año 2016 se observó una disminución significativa en el caudal del río Puelo, así como también una disminución en las precipitaciones en la región de Los Lagos, caracterizándose por ser uno de los veranos más secos en los últimos 70 años (Garreaud 2018, Aguayo et al. 2019). En marzo de 2016, el flujo del río Puelo disminuyó a menos de la mitad del flujo histórico promedio entre 1950 y 2016 (León-Muñoz et al. 2018), mes que coincidió con el intenso evento de *P. verruculosa*. La disminución de caudal y precipitaciones, generó un incremento de la salinidad superficial (>31 psu), lo que sumado a un aumento significativo en la concentración de nutrientes, principalmente nitrato (Rivera et al. 2017), favoreció el crecimiento de esta microalga, dando origen a la intensa floración de esta especie (Clément et

al. 2016). Lo anterior, se relaciona directamente con los resultados obtenidos en este estudio, dando cuenta que las altas salinidades (30 psu) favorecen el crecimiento de *P. verruculosa* y sugiere que la entrada de agua dulce en la zona puede actuar como una barrera ambiental. Sin embargo, esta barrera no produciría un efecto negativo para el crecimiento de *H. akashiwo*, debido a que esta especie crece en un amplio rango de salinidades, situación que fue evidenciada en estudio, ya que la cepa mostró elevadas tasas de crecimiento en todo el rango de salinidad (10 a 30 psu) a la que fue expuesta. Martínez et al. (2010) demostró que el crecimiento de *H. akashiwo* es muy bajo o simplemente nulo a salinidades de 5 psu. No obstante, Yamochi and Abe (1984) señala que esta especie tiene la capacidad de traspasar gradientes de salinidades muy bajos (5.7 psu), por lo que es considerado un flagelado eurihalino, ya que crece en un rango de salinidad muy amplio, entre 5 a 35 psu, lo que la convierte en una especie potencialmente peligrosa debido a crecer adecuadamente en diferentes ambientes y además migrar a través de fuertes gradientes de salinidad con el fin de escapar de sus depredadores (ciliados) y crecer adecuadamente (Strom et al. 2013).

Algunos autores como Kirst (1990), sugieren que el crecimiento de una determinada especie microalgal depende principalmente de la radiación y la temperatura, mientras que Yamochi and Abe (1984) proponen que el crecimiento además de estar limitado por la temperatura y salinidad, está limitado por la presencia de ciertos nutrientes y elementos traza como el nitrógeno, fósforo y hierro. Nuestros resultados refuerzan aún más las observaciones realizadas por estos autores y ponen de manifiesto los diferentes nichos que explotan las microalgas. Mientras, *H. akashiwo* puede crecer de forma óptima en un amplio rango de salinidad y temperatura, *P. verruculosa* únicamente lo hace en condiciones de alta salinidad (30 psu) y en de manera óptima a 15°C. Estas condiciones óptimas de cultivo detectadas para *P. verruculosa*, coinciden perfectamente con las condiciones oceanográficas y meteorológicas anómalas registradas en verano de 2016, las cuales fueron caracterizadas por elevada temperatura superficial (15-16 °C), salinidades de 30 psu, alta radiación solar (González et al. 2013, Garreaud 2018) y un aumento significativo de la concentración de nutrientes durante febrero y marzo de ese año (Rivera et al. 2017), lo que generó las condiciones óptimas para la formación y mantención de la intensa floración de *P. verruculosa* en el fiordo y Seno de Reloncaví (León-Muñoz et al. 2018).

4.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA, SALINIDAD Y CONDICIÓN ÓPTIMA DE CRECIMIENTO EN CULTIVOS DE *H. akashiwo* y *P. verruculosa*

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que las cepas aisladas de *H. akashiwo* y *P. verruculosa* presentan diferencias importantes en cuanto a densidades celulares máximas alcanzadas y tasas de crecimiento. La especie *H. akashiwo* es capaz de aclimatarse a diferentes condiciones de temperatura y salinidad, tal como se describe en los estudios mencionados previamente (Yamochi & Abe 1984, Martínez et al. 2010), mientras *P. verruculosa* lo hace únicamente a salinidades elevadas (30 psu), independiente de la temperatura. Mardones et al. (2012) detectaron que ambas especies comparten nichos ecológicos similares, reportando su aparición en condiciones de temperatura del agua que va desde los 11.2 a 17.3°C y salinidades entre 11.4 a 33.3 psu, siendo más abundante a 25 psu para *H. akashiwo*, similares a las condiciones establecidas en este estudio, donde las densidades celulares máximas alcanzadas fueron a 15°C y 20 psu. Además, coincide con lo reportado en la literatura internacional, donde se describe que la clase Raphidophyceae forma grandes floraciones en ambientes que superan los 15°C y disminuye considerablemente cuando las temperaturas caen por debajo de los 15°C, siendo ausentes a temperaturas inferiores a 10°C (Steidinger & Meave del Castillo 2018).

Por otra parte, Clément et al. (2016) reportaron condiciones de temperatura y salinidad de 15.1°C y 32.5 psu en el evento ocurrido durante el verano de 2016 en la región de Los Lagos, condiciones similares a las obtenidas en esta investigación, donde *P. verruculosa* alcanzó densidades celulares máximas a 15°C y 30 psu. Eckford-Soper and Daugbjerg (2017) mencionan algunos parámetros de crecimiento en laboratorio, en términos de temperatura y salinidad para el género *Pseudochattonella*, demostrando que esta especie puede crecer en un amplio rango de temperaturas, entre 10 y 20°C, y salinidades óptimas entre 19 y 25 psu. Recientemente, Mardones et al. (2019) reportaron densidades celulares máximas (8.43×10^4 células mL⁻¹) a 15°C y 30 psu para la cepa chilena *P. verruculosa*, alcanzando tasas de crecimiento de 1.44 div/día⁻¹ a 15°C y 20 psu. Las densidades celulares obtenidas en nuestro estudio fueron claramente superiores a las obtenidas en otros estudios, alcanzando densidades celulares máximas que superan en un orden de magnitud (8.88×10^5 células mL⁻¹) a las reportadas por Mardones et al. (2019) a 15°C y 30 psu, con tasas de crecimiento de 1.06 div/día⁻¹ a 18°C

y 30 psu (Tabla 1). Cabe destacar que el estudio de Mardones et al. (2019) fue realizado utilizando las mismas cepas de *P. verruculosa* y las diferencias observadas en densidades celulares y tasas de crecimiento pueden estar dada por varios factores, entre ellos se encuentra: temperatura, salinidad, medio de cultivo, fotoperiodo e irradiancia, que difieren con las utilizadas en nuestro estudio.

Existen muchos factores que pueden afectar el crecimiento de las microalgas nocivas, pero las condiciones de temperatura y salinidad pueden ser factores interdependientes en el crecimiento e ictiotoxicidad de las especies estudiadas.

4.2. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ICTIOTÓXICO DE LAS ESPECIE *H. akashiwo* Y *P. verruculosa* EN LÍNEAS CELULARES DE SALMÓN CHINOOK (CHSE-214) A TRAVÉS DE ENSAYO MTT

Las líneas celulares de peces, como las RTgill-W1, EPC y en especial la línea celular de embrión de salmón Chinook (CHSE-214) se han utilizado para evaluar viabilidad en estudios de citotoxicidad (Davoren et al. 2005, Skjelbred et al. 2011, Astuya et al. 2018). El ensayo colorimétrico MTT ha sido utilizado ampliamente para evaluar viabilidad celular en pruebas de citotoxicidad para determinar el efecto que producen ciertos metales (Srikanth et al. 2017), determinar el efecto de ácidos grasos (Rubio Mejia 2015) y en estudios que involucran a microalgas nocivas (Astuya et al. 2018). Los tratamientos de exposición de ambas cepas chilenas mostraron diferencias en la actividad lítica sobre las líneas celulares CHSE-214. En el caso de la especie *H. akashiwo*, se observó pérdida de viabilidad celular en un 100% cuando fueron expuestas a células directas en bajas densidades celulares (~ 20 células mL^{-1} a 30 psu), por otra parte, la viabilidad celular aumentó conforme aumentaba de la densidad celular. No obstante, la viabilidad no superó el 50% cuando las líneas celulares fueron expuestas a más de 2.000 células mL^{-1} . De igual manera, la exposición directa a bajas densidades celulares (20 células mL^{-1}) y salinidades más bajas (20 psu), provocaron pérdida de la viabilidad celular en un 90%. De forma similar, la viabilidad celular tuvo la misma tendencia, a no superar el 65% de viabilidad cuando fueron expuestas a densidades celulares superiores a 2.000 células mL^{-1} . Estos resultados se asemejan a los estudios de campo, donde se asociaron mortalidades de hasta un 40% del salmón producido en el sur Chile con baja

abundancia celular, donde *H. akashiwo* demostró ser extremadamente tóxica a bajas densidades celulares (40 células mL⁻¹). Sin embargo, para *P. verruculosa* estos resultados difieren de los estudios en terreno, donde se observa la alta toxicidad de esta especie a bajas densidades celulares, 5 células mL⁻¹ (Mardones et al. 2012).

En esta investigación, las líneas celulares CHSE-214 fueron expuestas a diferentes densidades celulares de las especies ictiotóxicas *H. akashiwo* y *P. verruculosa*, con el objetivo de evaluar qué dosis podría ser más tóxica, basándose en los estudios de campo y laboratorio de años anteriores (Mardones et al. 2012, Mardones et al. 2019). Mardones et al. (2019) mostraron que la cepa chilena de *P. verruculosa* ejerció una disminución de la viabilidad celular en las líneas celulares RTgill-W1 hasta en un 45% a una densidad de 100.000 células mL⁻¹ después de 1 hora de exposición. Un efecto similar al obtenido en este estudio, con una disminución de la viabilidad celular en un 40% a una densidad de 200.000 células mL⁻¹ después de 1 hora de exposición. Al igual que el estudio de Mardones et al. (2019), en esta investigación se probaron los tratamientos de las cepas de ambas especies inmediatamente después de su extracción, evidenciando que la exposición a los distintos tratamientos de *P. verruculosa* y *H. akashiwo* son más tóxicos cuando se exponen de inmediato. Por otra parte, en el estudio de Andersen et al. (2015) observaron que la presencia física de las células de la especie *Pseudochattonella* puede inducir un efecto tóxico en los peces, sin embargo, en nuestro estudio, la citotoxicidad se ve reducida en las células CHSE-214, mostrando una reducción de la viabilidad celular en un 22% con respecto al control. No obstante, se puede observar un efecto más agudo en los otros dos tratamientos (sobrenadante y lisis). En contraste con *P. verruculosa*, *H. akashiwo* mostró un efecto altamente tóxico cuando hubo interacción directa entre las microalgas y las líneas celulares CHSE-214, lo que sugiere que el contacto directo sí puede inducir la toxicidad de la especie, debido a que los exudados (sobrenadante y lisis) de *H. akashiwo* provocaron una citotoxicidad reducida en las líneas celulares de salmón Chinook. La toxicidad de *P. verruculosa* fue mayor en los tratamientos de sobrenadante y lisis celular, esto sugiere que liberan algún componente lítico al medio libre de células. Por el contrario, *H. akashiwo* tiene una porción más lítica unida a la célula.

La ictiotoxicidad de ambas especies no está del todo clara, algunos estudios señalan los posibles mecanismos de acción de la clase raphidophyceae y dictyochophyceae, entre ellos se encuentra la producción de ácidos grasos libres (FFA), especies reactivas de oxígeno (ROS)

(Marshall et al. 2003), ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's) (Andersen et al. 2015) y brevetoxinas (Dorantes-Aranda et al. 2015). Algunas investigaciones señalan que la generación de ROS por algunas especies ictiotóxicas tiene por objetivo reducir el crecimiento de otras especies, con el fin de colonizar el ambiente donde se encuentren, también como mecanismo de defensa por posibles depredadores o bien cuando las condiciones ambientales son desfavorables, provocando el estrés a la especie liberando ROS al medio (Diaz & Plummer 2018). Del mismo modo, otros estudios han sugerido que la producción de ROS, sola o en combinación con PUFA's, puede causar la toxicidad de algunas especies de microalgas (Marshall et al. 2003, Skjelbred et al. 2011, Mardones et al. 2015). Sin embargo, nunca se ha demostrado experimentalmente que ambas cepas chilenas liberen PUFA's o que generen ROS extracelular y que estos dos mecanismos estén involucrados en la ictiotoxicidad. No obstante, algunos autores han demostrado que las especies de *Pseudochattonella* producen PUFA's y otros compuestos (Dittami & Edvardsen 2012).

Existen estudios que explicarían el posible mecanismo de acción de las especies ictiotóxicas, como el estudio de Marshall et al. (2003), que describe cómo la especie *Chattonella marina* produciría ROS y FFA, cuando las células de *C. marina* entran en contacto con las lamelas branquiales de los peces mediante la ventilación, se genera la ruptura de las microalgas, liberando el contenido celular al entorno el cual se hidroliza, produciendo altos niveles de ROS y FFA. Dicha peroxidación lipídica tendría en las branquias de los peces, lo que genera finalmente una reducción en la capacidad respiratoria y osmorreguladora, permitiendo la transferencia de FFA y oxígeno al torrente sanguíneo, provocando la muerte del pez.

El presente estudio demostró que la temperatura en combinación con la salinidad tuvo un efecto significativo sobre el potencial ictiotóxico de *H. akashiwo*, demostrando que los cultivos a 15 °C y 30 psu fueron más tóxicos que los cultivos a 20 psu en todos los tratamientos de exposición. A diferencia de *P. verruculosa*, la combinación de temperatura y salinidad tuvo un efecto ictiotóxico menor a la de *H. akashiwo*. También se observó que la ictiotoxicidad en ambas especies se dio a salinidades más elevadas (30 psu). En cuanto a la dosis de exposición, los resultados demostraron que la ictiotoxicidad de *H. akashiwo* es elevada a bajas densidades celulares cuando se exponen directamente a las líneas celulares, mientras que, en los otros tratamientos, el potencial ictiotóxico es más bajo, pero aun así

siguen siendo más ictiotóxicas que la cepa de *P. verruculosa*. Una diferencia importante entre ambas cepas chilenas es que el efecto ictiotóxico de *P. verruculosa* es dependiente de la dosis, la ictiototixidad aumenta conforme al aumento de densidad celular y se ve reflejado en todos los tratamientos de exposición. A su vez, *H. akashiwo* genera alto nivel de ictiotoxicidad en distintas condiciones de crecimiento y en todos los tratamientos de exposición. También se observa una tendencia a ser más ictiotóxica a bajas densidades celulares en todos los tratamientos y condiciones de crecimiento.



5. CONCLUSIONES

El efecto combinado de la temperatura y salinidad en el crecimiento de las cepas chilenas de *H. akashiwo* y *P. verruculosa* no han sido examinados en profundidad, ya que sólo se han realizado estudios de crecimiento con algún parámetro establecido de temperatura o salinidad, lo que dificulta establecer la condición óptima de crecimiento para ambas especies. En este estudio, los resultados en cuanto a la condición óptima de crecimiento se ven reflejado en las tasas de crecimiento de ambas especies, demostrando que *P. verruculosa* tiene una tasa de crecimiento más alta que *H. akashiwo*. Sin embargo, *H. akashiwo* tiene la capacidad de crecer en todas las condiciones de temperatura y salinidad establecidas en este estudio, no así *P. verruculosa* que demostró crecimiento óptimo en una sola condición de salinidad, la más alta utilizada en este estudio (30 psu). Por otra parte, la temperatura no fue un factor limitante para su desarrollo. En consecuencia, los cambios de salinidad fueron un factor importante para el crecimiento de *P. verruculosa* y presumiblemente su potencial ictiotóxico.

Las altas tasas de crecimiento de *P. verruculosa* a elevada salinidad y temperatura en este estudio, puede ayudar a comprender la floración y el potencial ictiotóxico registrado el año 2016 en el sur de Chile. En contraste, *H. akashiwo* mostró un crecimiento óptimo en un amplio rango de salinidad y temperatura, lo que sugiere es que esta especie tiene características fisiológicas considerablemente diferentes a las de *P. verruculosa*, y en base a las características fisiológicas obtenidas en este estudio, existe la posibilidad de futuros brotes de esta especie en zonas donde previamente no han sido afectadas.

En este estudio se observó un efecto diferencial entre ambas especies, en cuanto a su tasa de crecimiento, densidades celulares y efecto ictiotóxico. En base a estos resultados se logró determinar cuales son las condiciones óptimas de crecimiento para ambas especies. La condición óptima de crecimiento para *H. akashiwo* fue a 15°C y 20 psu, mientras que *P. verruculosa* lo hizo a 18°C y 30 psu. Por lo cual, el presente trabajo ha confirmado empíricamente las condiciones óptimas de crecimiento, en términos de temperatura y salinidad de las cepas chilenas *H. akashiwo* y *P. verruculosa*, demostrando además que su potencial ictiotóxicos sobre las líneas celulares de salmón Chinook (CHSE-214).

Hasta ahora, ambos géneros se han relacionado con eventos de mortalidad masiva de peces, especialmente de salmones, por lo que nuestro estudio reafirma que las cepas chilenas son ictiotóxicas y pueden ser dañinas a bajas densidades celulares, como es el caso de *H. akashiwo*, la cual se vincula como la causante de mortalidades masivas de salmones a bajas densidades celulares en nuestro país. En cuanto a *P. verruculosa*, se confirma que esta especie es ictiotóxica a elevada densidades celulares y que posee componentes líticos intracelulares.

Utilizar células vivas en los ensayos de viabilidad celular permitió demostrar que existe un efecto ictiotóxico elevado en las cepas chilenas de *H. akashiwo*, ya que, al entrar en contacto directo con las líneas celulares, estas inducen una mayor citotoxicidad, lo que resulta en una mayor pérdida de viabilidad en comparación a los otros tratamientos (sobrenadante y lisis celular). En consecuencia, esta metodología constituye una herramienta valiosa para evaluar el efecto ictiotóxico de *H. akashiwo*. Queda demostrado que ambas especies tienen diferentes mecanismos de acción para causar ictiotoxicidad. *H. akashiwo* desarrolla mayor ictiotoxicidad estando en contacto directo con las líneas CHSE-214 a bajas densidades celulares, mientras que *P. verruculosa* genera mayor ictiotoxicidad cuando se exponen los exudados de las células (sobrenadante y lisis celular) sobre las líneas celulares. En términos generales, la liberación del contenido intracelular puede señalarse como la parte más ictiotóxica en *P. verruculosa*.

RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS

Dada las condiciones meteorológicas y oceanográficas anómalas en las que se generan las floraciones de las cepas chilenas *H. akashiwo* y *P. verruculosa*, queda por investigar el efecto de otros factores que pueden gatillar su proliferación, como es el caso del nitrato, debido a que se observaron niveles elevados durante la última floración en el 2016. También se debería investigar si el potencial ictiotóxico de ambas especies se ve aumentado o disminuido en otra condición de crecimiento, como la fase de crecimiento estacionaria.

Queda por realizar estudios que comprueben la producción de ROS y PUFA's en ambas cepas chilenas, con el fin de entender de mejor forma el mecanismo ictiotóxico. Además, es importante realizar los experimentos de ictiotoxicidad con otro ensayo colorimétrico, ya que el MTT no funciona bien con algunas líneas celulares de peces, posiblemente debido a la baja actividad de succinato deshidrogenasa en las mitocondrias, por lo que se recomienda utilizar otro tinte para medir el metabolismo, por ejemplo, Alamar Blue.



6. LITERATURA CITADA

- Aguayo R, León-Muñoz J, Vargas-Baecheler J, Montecinos A, Garreaud R, Urbina M, Soto D, Iriarte JL (2019) The glass half-empty: climate change drives lower freshwater input in the coastal system of the Chilean Northern Patagonia. *Climatic Change*:doi:10.1007/s10584-10019-02495-10586
- Aguilera-Belmonte A, Inostroza I, Franco JM, Riobo P, Gómez PI (2011) The growth, toxicity and genetic characterization of seven strains of *Alexandrium catenella* (Whedon and Kofoid) Balech 1985 (Dinophyceae) isolated during the 2009 summer outbreak in southern Chile. *Harmful Algae* 12:105-112
- Aguilera-Belmonte A, Inostroza I, Saéz Carrillo K, Franco JM, Riobo P, Gómez PI (2013) The combined effect of salinity and temperature on the growth and toxin content of four Chilean strains of *Alexandrium catenella* (Whedon and Kofoid) Balech 1985 (Dinophyceae) isolated from an outbreak occurring in southern Chile in 2009. *Harmful Algae* 23:55-59
- Andersen NG, Hansen PJ, Engell-Sørensen K, Nørremark LH, Andersen PO, Lorenzen E, Lorenzen N (2015) Ichthyotoxicity of the microalgae *Pseudochattonella farcimen* under laboratory and field conditions in Danish waters. *Diseases of aquatic organisms* 116:165-172
- Anderson DM, Burkholder JM, Cochlan WP, Glibert PM, Gobler CJ, Heil CA, Kudela RM, Parsons ML, Rensel JE, Townsend DW, Trainer VL, Vargo GA (2008) Harmful algal blooms and eutrophication: examining linkages from selected coastal regions of the United States. *Harmful Algae* 8:39-53
- Astuya A, Rivera A, Vega-Drake K, Aburto C, Cruzat F, Ulloa V, Caprile T, Gallardo-Rodríguez JJ (2018) Study of the ichthyotoxic microalga *Heterosigma akashiwo* by transcriptional activation of sublethal marker Hsp70b in Transwell co-culture assays. *PloS One* 13:8
- Avaria S, Cáceres M, Muñoz P, Palma S, Vera P (1999) Plan nacional sobre floraciones de algas nocivas en Chile. Valparaiso, Chile

- Castillo MI, Cifuentes U, Pizarro O, Djurfeldt L, Caceres M (2016) Seasonal hydrography and surface outflow in a fjord with a deep sill: the Reloncaví fjord, Chile. *Ocean Sci Discuss* 12:533–544
- Chang FH, Sutherland JE, McVeagh M, Gall M (2014) Molecular phylogeny, pigment composition, toxicology and life history of *Pseudochattonella cf. verruculosa* (class Dictyochophyceae) from Wellington harbour, New Zealand. *Harmful Algae* 34:42-55
- Clément A, Lincoqueo L, Saldivia M, Brito CG, Muñoz F, Fernández C, Pérez F, Maluje CP, Correa N, Mondaca V, Contreras G (2016) Exceptional summer conditions and HABs of *Pseudochattonella* in southern Chile create record impacts on salmon farm. *Harmful Algae News* 53:1-3
- Davoren M, Shúilleabháin SN, Hartl MG, Sheehan D, O'Brien NM, O'Halloran J, Van Pelt FN, Mothersill C (2005) Assessing the potential of fish cell lines as tools for the cytotoxicity testing of estuarine sediment aqueous elutriates. *Toxicology in vitro* 19:421-431
- Diaz JM, Plummer S (2018) Production of extracellular reactive oxygen species by phytoplankton: past and future directions. *J Plankton Res* 40:655-666
- Díaz PA, Álvarez A, Varela D, Pérez-Santos I, Díaz M, Molinet C, Seguel M, Aguilera-Belmonte A, Guzmán L, Uribe E, Rengel J, Hernández C, Segura C, Figueroa RI (2019) Impacts of harmful algal blooms on the aquaculture industry: Chile as a case study. *Perspectives in Phycology*:DOI: 10.1127/pip/2019/0081
- Dittami SM, Edvardsen B (2012) Culture conditions influence cellular rna content in ichthyotoxic flagellates of the genus *Pseudochattonella* (Dictyochophyceae) *J Phycol* 48:1050-1055
- Dorantes-Aranda JJ, Seger A, Mardones JI, Nichols PD, Hallegraeff GM (2015) Progress in understanding algal bloom-mediated fish kills: the role of superoxide radicals, phycotoxins and fatty acids. *PloS One* 10:7
- Eckford-Soper L, Daugbjerg N (2017) Interspecific competition study between *Pseudochattonella farcimen* and *P. verruculosa* (Dictyochophyceae)—Two ichthyotoxic species that co-occur in Scandinavian waters. *Microbial Ecology* 73:259-270

- FAO (2004) Marine Biotoxin. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy
- Garreaud R (2018) Record-breaking climate anomalies lead to severe drought and environmental disruption in western Patagonia in 2016. *Climate Research* 74:217-229
- GEOHAB (2012) Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms, GEOHAB Core Research Project: HABs in Benthic Systems. IOC of UNESCO and SCOR, Paris and Newark
- González HE, Castro LR, Daneri G, Iriarte JL, Silva N, Tapia F, Teca E, Vargas CA (2013) Land-ocean gradient in haline stratification and its effects on plankton dynamics and trophic carbon fluxes in Chilean Patagonian fjords (47–50° S). *Prog Oceanogr* 119:32-47
- Granéli E, Codd GA, Dale B, Lipiatou E, Maestrini SY, Rosenthal H (1999) EUROHAB Science Initiative: Harmful Algal Blooms in European Marine and Brackish Waters. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- Guillard R, Hargraves P (1993) *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia* 32:234-236
- Guillard RRL (1973) Division rates. In: Stein JR (ed) *Handbook of Phycological Methods Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, New York
- Guiry MD, Guiry GM (2020) AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 15 April 2020.
- Guzmán L, Campodonico I, Antunovic M (1975) Estudios sobre un florecimiento toxico causado por *Gonyaulax catenella* en Magallanes. IV. Distribución y niveles de veneno paralítico de los mariscos (noviembre de 1972 - noviembre de 1973). *An Inst Patagon* 6:209-223
- Guzmán L, Pacheco H, Pizarro G, Alárcon C (2002) *Alexandrium catenella* y veneno paralizante de los mariscos en Chile. In: Sar EA, Ferrario ME, Reguera B (eds) *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*, Book 11. Instituto Español de Oceanografía, Madrid
- Hallegraeff G (2010) Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: a formidable predictive challenge. *J Phycol* 46:220-235

- Hallegraeff GM (1993) A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32:79-99
- Hara Y, Doi K, Chihara M (1994) Four new species of *Chattonella* (Raphidophyceae, Chromophyta) from Japan. *Japanese Journal of Phycology* 42
- Hosoi-Tanabe S, Honda D, Fukuya S, Otake I, Inagaki Y, Sako Y (2007) Proposal of *Pseudochattonella verruculosa* gen. nov., comb. nov. (Dictyochophyceae) for a former raphidophycean alga *Chattonella verruculosa*, based on 18S rDNA phylogeny and ultrastructural characteristics. *Phycological Research* 55
- Imai I, Yamaguchi M (2012) Life cycle, physiology, ecology and red tide occurrences of the fish-killing raphidophyte *Chattonella*. *Harmful Algae* 14:46-70
- Kirst GO (1990) Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41:21-53
- Klöpffer S, John U, Zingone A, Mangoni O, Kooistra WH, Cembella AD (2013) Phylogeny and morphology of a *Chattonella* (Raphidophyceae) species from the Mediterranean Sea: what is *C. subsalsa*? . *Eur J Phycol* 48:79-92
- León-Muñoz J, Urbina MA, Garreaud R, Iriarte JL (2018) Hydroclimatic conditions trigger record harmful algal bloom in western Patagonia (summer 2016). *Sci Rep* 8:1330
- Mardones J, Clément A, Rojas X (2012) Monitoring potentially ichthyotoxic phytoflagellates in southern fjords of Chile. *Harmful Algae News* 45:6-7
- Mardones JI, Dorantes-Aranda JJ, Nichols PD, Hallegraeff GM (2015) Fish gill damage by the dinoflagellate *Alexandrium catenella* from Chilean fjords: Synergistic action of ROS and PUFA. *Harmful Algae* 49:40-49
- Mardones JI, Fuenzalida G, Zenteno K, Alves-de-Souza A, Astuya A, Dorantes-Aranda JJ (2019) Salinity-growth response and ichthyotoxic potency of the Chilean *Pseudochattonella verruculosa*. *Front Mar Sci* 6:24
- Marshall J, Nichols PD, Hamilton B, Lewis R, Hallegraeff G (2003) Ichthyotoxicity of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) to damselfish (*Acanthochromis polycaanthus*): the synergistic role of reactive oxygen species and free fatty acids. *Harmful Algae* 2:273-281

- Martínez R, Orive E, Laza-Martínez A, Seoane S (2010) Growth response of six strains of *Heterosigma akashiwo* to varying temperature, salinity and irradiance conditions J Plankton Res 32:529-538
- MINSAL (2008) Programa nacional de vigilancia y control de las intoxicaciones por fenómenos algales nocivos (“Marea Roja”). Ministerio de Salud, Subsecretaría de Salud Pública. 26 pp.
- Molinet C, Lafón A., Lembeye G, C.A. M (2003) Patrones de distribución espacial y temporal de floraciones de *Alexandrium catenella* (Whedon & Kofoid) Balech 1985, en aguas interiores de la Patagonia noroccidental de Chile. Rev Chil Hist Nat 76:681-698
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods 65:55-63
- Nakamura A, Okamoto T, Komatsu N, Ooka S, Oda T, Ishimaru A, Muramatsu T (1998) Fish mucus stimulates the generation of superoxide anion by *Chattonella antiqua* and *Heterosigma akashiwo*. Fisheries Science 64:866–869
- Rensel JE (2007) Fish kills from the harmful alga *Heterosigma akashiwo* in Puget Sound: Recent Blooms and Review. Prepared by Rensel Associates Aquatic Sciences for the National Oceanic and Atmospheric Administration Center for Sponsored Coastal Ocean Research (CSCOR), Washington, DC, 59 pp., <http://www.whoi.edu/fileserver.do?id=39383&pt=2&p=29109>.
- Rivera P, Aguilera-Belmonte A, Seguel M, Díaz PA (2017) Dinámica de una floración intensa de *Pseudochattonella verruculosa* en el sur de Chile: Evaluación de los severos impactos en la salmonicultura. IV Congreso SOMEFAN - II Reunión ALEAN, 23-27 Octubre 2017. Cancún, Mexico.
- Rubio Mejia OL (2015) The CHSE-214 salmon cell line as a model to study molecular regulation of long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in salmonids. PhD, University of Stirling, Stirling, Scotland, United Kingdom
- Silva N, Sievers H, Prado R (1995) Características oceanográficas y una proposición de circulación, para algunos canales australes de Chile entre 41°20’S y 46°40’S. Rev Biol Mar 30:207-254

- Skjelbred B, Horsberg TE, Tollefsen KE, Andersen T, Edvardsen B (2011) Toxicity of the ichthyotoxic marine flagellate *Pseudochattonella* (Dictyochophyceae, Heterokonta) assessed by six bioassays. *Harmful Algae* 10:144-154
- Srikanth K, Trindade T, Duarte AC, Pereira E (2017) Cytotoxicity and oxidative stress responses of silica-coated iron oxide nanoparticles in CHSE-214 cells. *Environ Sci Pollut Res* 24:2055-2064
- Steidinger KA, Meave del Castillo ME (2018) Guide to the identification of harmful microalgae in the Gulf of Mexico, Volume I: Taxonomy. St. Petersburg, FL, 384 pp.
- Strom SL, Harvey EL, Fredrickson KA, Menden-Deuer S (2013) Broad salinity tolerance as a refuge from predation in the harmful Raphidophyte Alga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *J Phycol* 49:20-31
- Varela D, Paredes J, Alves de Souza C, Seguel M, Sfeir A, Frangópulos M (2012) Intraregional variation among *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) strains from southern Chile: Morphological, toxicological and genetic diversity. *Harmful Algae* 15
- Yamaguchi M, Shigeru I, Nagasaki K, Matsuyama Y, Uchida T, Imai I (1997) Effects of temperature and salinity on the growth of the red tide flagellates *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) and *Chattonella verruculosa* (Raphidophyceae). *J Plankton Res* 19:1167-1174
- Yamochi S, Abe T (1984) Mechanisms to initiate a *Heterosigma akashiwo* red tide in Osaka Bay. *Mar Biol* 83:255-261