



**Universidad de Concepción
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS**

**INFLUENCIA DE LA SALINIDAD Y DE LA FUENTE DE NITRÓGENO EN EL
CRECIMIENTO Y TOXICIDAD DE LA MICROALGA ICTIOTÓXICA
HETEROSIGMA AKASHIWO (RAPHIDOPHYCEAE)**

POR NATALIA BELÉN MARTÍNEZ FUENTES

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de
Concepción para optar al grado de Magíster en Ciencias con Mención en Botánica

Profesora Tutor(a)
Dra. Patricia Gómez Vergara
Universidad de Concepción

Marzo de 2026
Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

AGRADECIMIENTOS

Vengo de una familia compuesta de mujeres aguerridas, inteligentes y dedicadas, las cuales han sido un ejemplo toda mi vida, y gracias a quienes nunca he pensado en ser menos.

Por ello, quiero comenzar agradeciendo a uno de mis pilares femeninos más importantes, mi madre, quien, frente a todo pronóstico, dadas las circunstancias económicas y familiares de ese entonces, me permitió soñar con estudiar y formarme profesionalmente. Tal vez no como un sueño que naciera de mí, sino uno que provenía de ella, pero que me impulsó a enfrentar nuevos desafíos, a seguir aprendiendo y a conocer personas que siempre atesoraré, por lo que te estoy profundamente agradecida. Si bien ha sido un camino largo, estoy feliz de concluirlo y dedicártelo, porque este logro también es tuyo.

En este recorrido también me ha acompañado incondicionalmente mi abuela, quien con paciencia enderezó mi camino, me nutrió física y mentalmente, confió en mí y me permitió llegar hasta aquí. Sin ti, nada de lo logrado habría sido posible. Te estaré siempre agradecida.

A veces, la familia también se encuentra lejos de los parajes donde uno nace. A ellos les agradezco por acompañarme, por ser esa contención y calidez que buscaba, incluso cuando no sabía si existía.

Expreso además un especial agradecimiento a mi profesora guía, quien, con mucha paciencia, y dedicación me acompañó hasta la culminación de este ciclo

académico. Ver su entrega y compromiso con la docencia, el conocimiento y las buenas prácticas ha sido un ejemplo y un privilegio que todo estudiante debería tener la oportunidad de experimentar.

Agradezco también al grupo de investigación microalgal FICOLAB, quienes hicieron de esta instancia, un lugar acogedor. Fueron un apoyo fundamental en momentos en que me sentí insegura y confundida. Cada uno de ustedes tuvo la disposición de enseñarme, corregirme y acompañarme, son personas de una calidad humana excepcional.

Finalmente, quisiera agradecer a las personas que integran el Laboratorio de Toxicología Acuática de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción, quienes siempre tuvieron la mejor disposición de abrir sus puertas, enseñarme y ser parte de esta investigación.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Floraciones algales nocivas	1
1.2 Factores que influyen en la aparición de FANs	2
1.3 <i>Heterosigma akashiwo</i>	3
1.4 Registro de FANs de <i>Heterosigma akashiwo</i> en el mundo	5
1.5 Mecanismos ictiotóxicos de <i>H. akashiwo</i>	7
1.6 Efecto de la fuente de nitrógeno (NO₃⁻, NH₄⁺ y urea) en algas nocivas	7
1.7 Efecto de la salinidad en <i>H. akashiwo</i>	10
1.8 Desempeño fotosintético en microalgas	12
1.9 Variabilidad intraespecífica en <i>H. akashiwo</i>	13
1.10 Evaluación de la toxicidad de <i>H. akashiwo</i> utilizando <i>Danio rerio</i> como modelo biológico	14
2. HIPÓTESIS	17
3. OBJETIVO GENERAL:	17
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	17
4. METODOLOGÍA	18
4.1 Material biológico	18
4.2 Condiciones de cultivo	19
4.3 Análisis de crecimiento	20
4.4 Fluorimetría de amplitud modulada por pulsos (PAM)	21
4.5 Análisis de pigmentos	22
4.6 Preparación de los extractos de <i>H. akashiwo</i> para los bioensayos en peces	23
4.7 Mantenimiento de <i>Danio rerio</i> y recolección de huevos	24
4.8 Ensayo preliminar de toxicidad de <i>Danio rerio</i> (pez cebra) frente a extractos de <i>H. akashiwo</i>	24

4.9 Evaluación de toxicidad de cepas de <i>H. akashiwo</i> cultivadas en distintas salinidades y fuentes de nitrógeno mediante bioensayo con <i>Danio rerio</i>	26
4.10 Análisis estadístico	27
5. RESULTADOS	28
5.1 Crecimiento	28
5.2 Pigmentos	32
5.3 Parámetros fotosintéticos	34
5.4 Bioensayo de toxicidad con <i>Danio rerio</i>	37
6. DISCUSIÓN	49
6.1 Efecto de la salinidad y fuente de nitrógeno en el crecimiento de <i>H. akashiwo</i>	51
6.2 Efecto de la salinidad y fuente de nitrógeno sobre el contenido de pigmentos y parámetros fotosintéticos en <i>H. akashiwo</i>	56
6.3 Toxicidad de los extractos de <i>H. akashiwo</i> cultivada en distintas salinidades y fuentes de nitrógeno.	62
7. CONCLUSIONES	67
8. BIBLIOGRAFÍA	70
9. ANEXO	81
9.1 Células de <i>H. akashiwo</i> de la cepa CCM-UdeC 225 y CCM-UdeC 279 en tratamientos con urea a 15 PSU y NH_4^+ a 15 PSU.	81
9.2 Exposición de embriones de <i>Danio rerio</i> a extracto <i>H. akashiwo</i> (CCM-UdeC 225).	82
9.3 Exposición de embriones de <i>Danio rerio</i> a extracto <i>H. akashiwo</i> (CCM-UdeC 279).	84
9.4 Análisis estadístico	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos preliminares con extractos de *H. akashiwo* (*H.a*) y *T. tetrahele* (*T.t*) en pocillos de 300 ul de volumen total, conteniendo 5 huevos de *D. rerio* en etapa de gastrulación. N=3. 25

Tabla 2. Tasa de crecimiento K (div. día⁻¹) y densidad celular máxima de las dos cepas de *Heterosigma akashiwo* incluidas en este estudio, cultivadas en tres salinidades y tres fuentes de nitrógeno. n= 4. Letras diferentes como superíndice indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de tres vías, Student Newman Keuls – SNK, p < 0,05). 31

Tabla 3. Contenido de clorofilas y carotenoides totales (expresado por volumen de cultivo y por célula), en cultivos de 10 días de las dos cepas de *H. akashiwo* incluidas en este estudio (n=4, ANOVA de tres vías, Student Newman Keuls – SNK, p < 0,05). 34

Tabla 4. Efectos subletales de embriones de *D. rerio* expuestos durante 72 horas a extractos de *H. akashiwo*. Se reportan el porcentaje de éxito de eclosión y las anomalías (retraso en el desarrollo y edemas) en embriones y larvarias sobrevivientes de cada ensayo. Se incluyeron medio E3 y extracto de *T. tetrahele* como controles en cada ensayo. Cada tratamiento incluyó inicialmente 30 huevos en fase de gastrulación (6 réplicas, 5 huevos cada una). 86

Tabla 5. Códigos utilizados para la identificación de los factores incluidos en el análisis estadístico. Se indican las cepas de *Heterosigma akashiwo* evaluadas (CCM-UdeC 225 y CCM-UdeC 279), las fuentes de nitrógeno empleadas (NH₄⁺, NO₃⁻ y urea) y los niveles de salinidad (15, 25 y 35 PSU), junto con sus respectivos códigos numéricos. 88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Tratamientos a evaluar con las dos cepas de *H. akashiwo* en estudio. 20

Figura 2. Curvas de crecimiento de *Heterosigma akashiwo* correspondientes a las cepas CCM-UdeC 225 (Chile) (**A, B, C**) y CCM-UdeC 279 (Nueva Zelanda) (**D, E, F**), cultivadas en tres niveles de salinidad (15, 25 y 35 PSU) y tres fuentes distintas de nitrógeno (NH₄⁺, NO₃⁻ y Urea). 30

Figura 3. Valores del rendimiento cuántico óptimo del Fotosistema II (FV/Fm) registrado para la cepa CCM-UdeC 225 **(A)** y la cepa CCM-UdeC 279 **(B)** en sus respectivos tratamientos. 36

Figura 4. Extinción no fotoquímica máxima (NPQmax) registrada en el día 10 para la cepa CCM-UdeC 225 **(A)** y la cepa CCM-UdeC 279 **(B)** en sus respectivos tratamientos. 37

Figura 5. Bioensayo preliminar con embriones de *Danio rerio* expuestos a las condiciones control: **A)** medio de cultivo control (EM); **B)** Extracto de *T. tetrahele* (100%); Imágenes correspondientes a las primeras 72 hrs de exposición. 38

Figura 6. Bioensayo preliminar con embriones de *Danio rerio* expuestos al extracto de la cepa CCM-UdeC 225 (aumento 3.2 x) **A)** y **B)** extracto de *H. akashiwo* al 25%; **C)** y **D)** extracto de *H. akashiwo* a 50%; **E)** y **F)** extracto de *H. akashiwo* al 62,5 %; **G)** y **H)** extracto de *H. akashiwo* al 75%; **I)** y **J)** extracto de *H. akashiwo* al 87.5%. Imágenes correspondientes a las primeras 72 hrs de exposición. 40

Figura 7. Bioensayo preliminar que evalúa diferentes concentraciones de *Heterosigma akashiwo* (cepa CCM-UdeC 225) en etapas tempranas del desarrollo de *Danio rerio*. Se muestran los porcentajes de mortalidad de huevos **(A)** y éxito de eclosión a las 72 horas post-exposición **(B)**. Se utilizaron como controles el medio E3 y extracto de *Tetraselmis tetrahele* al 100 %. Las barras representan la media \pm error estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el medio control E3, determinadas mediante análisis de Kruskal-Wallis seguido de la prueba post hoc de Dunn ($p < 0,05$). 41

Figura 8. Mortalidad en embriones de *Danio rerio* 48 horas después de la exposición a extractos de *Heterosigma akashiwo* de las cepas CCM-UdeC 225 **(A)** y CCM-UdeC 279 **(B)**, cultivados en diferentes condiciones de salinidad y fuente de nitrógeno. Se utilizó medio E3 y extracto 100 % de *Tetraselmis tetrahele* como controles. Las barras representan la media \pm error estándar. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, determinadas mediante el análisis de Kruskal-Wallis seguido de la prueba post hoc de Dunn ($p < 0,05$). 44

Figura 9. Éxito de eclosión en embriones de *Danio rerio* 72 horas después de la exposición a extractos de *Heterosigma akashiwo* de las cepas CCM-UdeC 225 **(A)** y CCM-UdeC 279 **(B)**, cultivados en diferentes condiciones de salinidad y fuente de nitrógeno. Se utilizó medio E3 y extracto 100 % de *Tetraselmis tetrahele* como

controles. Las barras representan la media \pm error estándar. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, determinadas mediante el análisis de Kruskal-Wallis seguido de la prueba post hoc de Dunn ($p < 0,05$). 46

Figura 10. Anomalías observadas en los embriones de *D. rerio* expuestos a los extractos de las cepas de *H. akashiwo* (CCM-UdeC 225 y CCM-UdeC 279) a una concentración del 25%, obtenidos a partir de cultivos mantenidos en distintas condiciones de salinidad y fuente de nitrógeno (aumento 2.0x). Entre las anomalías se registró una pigmentación ausente o deficiente **C)** y **E)**, absorción incompleta del vitelo **A)**, **B)** y **C)**, hemorragia **B)**, lordosis **B)**, escoliosis **B)**, desarrollo embrionario incompleto **D)** y **F)**, edema pericárdico **A)** y **B)**, edema vitelino **C)** y **E)**. 47

Figura 11. Células de *H. akashiwo* de la cepa CCM-UdeC 225 (**A)**, **B)** y **C)** y CCM-UdeC 279 (**D)**, **E)** y **F)**, cultivadas en tratamientos con urea a 15 PSU. La barra de escala corresponden a 10 μm (células fijadas con Lugol) 82

Figura 12. Células de *H. akashiwo* de la cepa CCM-UdeC 225 (**A)**, **B)** y **C)** y CCM-UdeC 279 (**D)**, **E)** y **F)**, cultivadas en tratamientos con NH_4^+ a 15 PSU. La barra de escala corresponde a 10 μm (células fijadas con Lugol). 82

Figura 13. Bioensayo con embriones de *Danio rerio* expuestos a extracto de la cepa CCM-UdeC 225 (aumento 1.25x). **A)** Extracto de *T. tetrahele*, **B)** Medio de cultivo control (E3) 1X, **C)** Extracto del tratamiento con NH_4^+ a 35 PSU, **D)** NO_3^- a 15 PSU, **E)** NO_3^- a 25 PSU, **F)** NO_3^- a 35 PSU, **G)** urea a 15 PSU, **H)** urea a 25 PSU y **I)** urea a 35 PSU. Imágenes correspondientes a las primeras 48 hrs de exposición. 83

Figura 14. Bioensayo con embriones de *Danio rerio* expuestos a extracto de la cepa CCM-UdeC 225 (aumento 2.0x). **A)** Extracto de *T. tetrahele*, **B)** Medio de cultivo control (EM), **C)** Extracto del tratamiento con NH_4^+ a 35 PSU, **D)** NO_3^- a 15 PSU, **E)** NO_3^- a 25 PSU, **F)** NO_3^- a 35 PSU, **G)** urea a 15 PSU, **H)** urea a 25 PSU y **I)** urea a 35 PSU. Imágenes correspondientes a las primeras 72 hrs de exposición. 84

Figura 15. Bioensayo con embriones de *Danio rerio* expuestos a extracto de la cepa CCM-UdeC 279 (aumento 1.25x- 1.5x). **A)** Extracto de *T. tetrahele*, **B)** Medio de cultivo control (EM), **C)** Extracto del tratamiento con NO_3^- a 15 PSU, **D)** NO_3^- a 25 PSU, **E)** NO_3^- a 35 PSU, **F)** urea a 15 PSU y **G)** urea a 35 PSU. Imágenes correspondientes a las primeras 48 hrs de exposición. 85

Figura 16. Bioensayo con embriones de *Danio rerio* expuestos a extracto de la cepa CCM-UdeC 225 (aumento 1.25-2.0x). **A)** Extracto de *T. tetrathele*, **B)** medio de cultivo control (EM), **C)** NO_3^- a 15 PSU, **D)** NO_3^- a 25 PSU, **E)** NO_3^- a 35 PSU, **F)** urea a 15 PSU y **G)** urea a 35 PSU. Imágenes correspondientes a las primeras 72 hrs de exposición.

86

Figura 17. A) Resultados del análisis de varianza de tres vías (ANOVA) aplicado a la densidad celular de los cultivos de *H. akashiwo*. **B)** Resultados del análisis de post hoc de Student-Newman-Keuls para la densidad celular. La tabla muestra la comparación múltiple entre los distintos tratamientos, considerando las combinaciones de cepa, fuente de nitrógeno y salinidad. Las diferencias significativas entre medias se indican mediante agrupaciones con letras distintas ($p < 0,05$).

88

Figura 18. A) Resultados del análisis de varianza de tres vías (ANOVA) aplicado a la tasa de crecimiento, K_{max} (divisiones d^{-1}) de los cultivos de *H. akashiwo*. **B)** Resultados del análisis de post hoc de Student-Newman-Keuls para tasa de crecimiento, K_{max} (divisiones d^{-1}). La tabla muestra la comparación múltiple entre los distintos tratamientos, considerando las combinaciones de cepa, fuente de nitrógeno y salinidad. Las diferencias significativas entre medias se indican mediante agrupaciones con letras distintas ($p < 0,05$).

88

Figura 19. A) Resultados del análisis de varianza de tres vías (ANOVA) aplicado a clorofila *a* ($\mu\text{g/L}$ cultivo) de los cultivos de *H. akashiwo*. **B)** Resultados del análisis de post hoc de Student-Newman-Keuls para clorofila *a* ($\mu\text{g/L}$ cultivo). La tabla muestra la comparación múltiple entre los distintos tratamientos, considerando las combinaciones de cepa, fuente de nitrógeno y salinidad. Las diferencias significativas entre medias se indican mediante agrupaciones con letras distintas ($p < 0,05$).

89

Figura 20. A) Resultados del análisis de varianza de tres vías (ANOVA) aplicado a clorofila *c1+c2* ($\mu\text{g/L}$ cultivo) de los cultivos de *H. akashiwo*. **B)** Resultados del análisis de post hoc de Student-Newman-Keuls para la clorofila *c1+c2* ($\mu\text{g/L}$ cultivo). La tabla muestra la comparación múltiple entre los distintos tratamientos, considerando las combinaciones de cepa, fuente de nitrógeno y salinidad. Las diferencias significativas entre medias se indican mediante agrupaciones con letras distintas ($p < 0,05$).

90

Figura 21. A) Resultados del análisis de varianza de tres vías (ANOVA) aplicado a carotenoides ($\mu\text{g/L}$ cultivo) de los cultivos de *H. akashiwo*. **B)** Resultados del análisis de post hoc de Student-Newman-Keuls para carotenoides ($\mu\text{g/L}$ cultivo). La tabla muestra la comparación múltiple entre los distintos tratamientos, considerando las

combinaciones de cepa, fuente de nitrógeno y salinidad. Las diferencias significativas entre medias se indican mediante agrupaciones con letras distintas ($p < 0,05$). 90

Figura 22. A) Resultados del análisis de varianza de tres vías (ANOVA) aplicado a clorofila a (pg/célula) de los cultivos de *H. akashiwo*. **A)** Resultados del análisis de post hoc de Student-Newman-Keuls para clorofila α (pg/célula). La tabla muestra la comparación múltiple entre los distintos tratamientos, considerando las combinaciones de cepa, fuente de nitrógeno y salinidad. Las diferencias significativas entre medias se indican mediante agrupaciones con letras distintas ($p < 0,05$). 90

Figura 23. A) Resultados del análisis de varianza de tres vías (ANOVA) aplicado clorofilas $c1+c2$ (pg/célula) de los cultivos de *H. akashiwo*. **B)** Resultados del análisis de post hoc de Student-Newman-Keuls para clorofilas $c1+c2$ (pg/célula). La tabla muestra la comparación múltiple entre los distintos tratamientos, considerando las combinaciones de cepa, fuente de nitrógeno y salinidad. Las diferencias significativas entre medias se indican mediante agrupaciones con letras distintas ($p < 0,05$). 91

Figura 24. A) Resultados del análisis de varianza de tres vías (ANOVA) aplicado carotenoides (pg/célula) de los cultivos de *H. akashiwo*. **B)** Resultados del análisis de post hoc de Student-Newman-Keuls para carotenoides (pg/célula). La tabla muestra la comparación múltiple entre los distintos tratamientos, considerando las combinaciones de cepa, fuente de nitrógeno y salinidad. Las diferencias significativas entre medias se indican mediante agrupaciones con letras distintas ($p < 0,05$). 91

Figura 25. A) Resultados del análisis de varianza de tres vías (ANOVA) aplicado a la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (FV/Fm) de los cultivos de *H. akashiwo*. **B)** Resultados del análisis de post hoc de Student-Newman-Keuls para la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (FV/Fm). La tabla muestra la comparación múltiple entre los distintos tratamientos, considerando las combinaciones de cepa, fuente de nitrógeno y salinidad. Las diferencias significativas entre medias se indican mediante agrupaciones con letras distintas ($p < 0,05$). 92

Figura 26. A) Resultados del análisis de varianza de tres vías (ANOVA) aplicado a la extinción no fotoquímica máxima de la fluorescencia de la clorofila (NPQmax) de los cultivos de *H. akashiwo*. **B)** Resultados del análisis de post hoc de Student-Newman-Keuls para la extinción no fotoquímica máxima de la fluorescencia de la clorofila (NPQmax). La tabla muestra la comparación múltiple entre los distintos tratamientos, considerando las combinaciones de cepa, fuente de nitrógeno y salinidad. Las diferencias significativas entre medias se indican mediante agrupaciones con letras distintas ($p < 0,05$). 92

RESUMEN

Las floraciones de algas nocivas (FANs) son un fenómeno natural de relevancia ecológica y socioeconómica, debido a sus efectos adversos sobre la salud humana, los ecosistemas costeros y la acuicultura. *Heterosigma akashiwo* es una rafiidófica marina ictiotóxica responsable de proliferaciones y eventos de mortalidad masiva de peces en diversas zonas costeras del mundo, incluyendo Chile. La dinámica de estas floraciones está fuertemente influenciada por factores ambientales, particularmente la salinidad y la disponibilidad de nutrientes, los cuales pueden afectar tanto el crecimiento como la toxicidad de esta especie. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto combinado de la salinidad (15, 25 y 35 PSU) y de la fuente de nitrógeno (NH_4Cl , NaNO_3 y urea) sobre el crecimiento, atributos fisiológicos y toxicidad de dos cepas de *H. akashiwo* de distinto origen geográfico: CCM-UdeC 225 (Chile) y CCM-UdeC 279 (= CCMP 302, Nueva Zelanda). El crecimiento de los cultivos se evaluó mediante conteo celular y se analizaron parámetros fotobiológicos y pigmentos fotosintéticos. Además, se prepararon lisados celulares para evaluar la toxicidad mediante bioensayos con embriones de pez cebra (*Danio rerio*). Los resultados evidenciaron respuestas diferenciadas entre cepas. El amonio promovió altas tasas de crecimiento y sus extractos indujeron letalidad total en embriones de *Danio rerio*. Además, la cepa CCM-UdeC 279 presentó una toxicidad superior en comparación con CCM-UdeC 225. Estos resultados evidencian una marcada variabilidad fisiológica y toxicológica entre cepas de esta especie.

ABSTRACT

Harmful algal blooms (HABs) are natural events with significant ecological and socioeconomic impacts, affecting human health, coastal ecosystems, and aquaculture. *Heterosigma akashiwo*, a marine raphidophyte, causes blooms and fish kills in various coastal regions worldwide, including Chile. These blooms are strongly influenced by environmental factors such as salinity and nutrient levels, which affect the growth and toxicity of the species. This study aimed to evaluate the combined effect of salinity (15, 25, and 35 PSU) and three nitrogen sources (NH_4Cl , NaNO_3 , and urea) on the growth, physiological traits, and toxicity of two strains of *H. akashiwo* from different locations: CCM-UdeC 225 (Chile) and CCM-UdeC 279 (= CCMP 302, New Zealand). Growth was measured through cell counts, and physiological traits were analyzed by examining photobiological parameters and photosynthetic pigments. Additionally, cell lysates were prepared to assess toxicity using bioassays with zebrafish embryos (*Danio rerio*). The results showed that both strains responded differently in terms of growth and physiological features. Ammonium promoted high growth rates, and its extracts caused complete lethality in *Danio rerio* embryos. Furthermore, strain CCM-UdeC 279 demonstrated significantly higher toxicity than strain CCM-UdeC 225. These findings underscore notable physiological and toxicological differences among strains of this species.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Floraciones algales nocivas

Las floraciones algales nocivas (FANs) son fenómenos naturales que se caracterizan por la proliferación de microalgas que generan algún efecto dañino para el ecosistema y/o la salud humana (Breckman *et al.*, 2025). El término FAN o en inglés HAB (Harmful Algae Bloom), fue acuñado por la Comisión Oceanográfica Intergubernamental (COI) de la UNESCO, con el fin de describir la aparición de microalgas que impactan negativamente a la salud humana, los bienes y servicios costeros, y poblaciones naturales de organismos marinos. Estas floraciones pueden manifestarse de diferentes formas según la especie y el cuerpo de agua en el que se desarrollan, pudiendo tener lugar en la superficie del agua y/o a profundidades específicas en la columna de agua (Sigee, 2005). Estos eventos son impredecibles y su magnitud puede variar de manera considerable en poco tiempo. Además, no todas las floraciones de algas nocivas tienen el mismo nivel de toxicidad, y es posible que esta toxicidad varíe con el transcurso del tiempo (Ono *et al.*, 2000).

Chile es uno de los principales focos mundiales propensos a experimentar floraciones algales nocivas de gran magnitud, al igual que Benguela, el noroeste de África y Perú (Smayda, 2000). En nuestro país, las FANs marinas han incrementado en las últimas décadas y se han concentrado

mayormente en la zona sur-austral, en fiordos y canales de las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes (Ugarte *et al.*, 2022).

1.2 Factores que influyen en la aparición de FANs

En los ecosistemas marinos, diversos procesos contribuyen al fenómeno de las floraciones algales nocivas. Estos procesos incluyen factores naturales como la circulación y estratificación, la surgencia marina, la química del agua, y los procesos biológicos y bioquímicos asociados con estos organismos acuáticos, tales como el aumento de tasa de crecimiento y capacidad de competir con otras algas, la reducción del pastoreo, la dispersión, la sedimentación y la mortalidad (Imberger *et al.*, 1983; Iriarte *et al.*, 2023). Además de estos factores naturales, los factores antropogénicos también desempeñan un papel importante, siendo la eutrofización uno de los principales problemas ambientales de alcance global (Anderson *et al.*, 2002).

La eutrofización implica el ingreso de nutrientes desde áreas continentales hacia las costas oceánicas y los sistemas marinos, a través de la descarga de aguas subterráneas, aguas residuales, actividades industriales, deposición atmosférica y el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados, como la urea, cuyo uso ha aumentado en los últimos años y representa más del 50% de los fertilizantes nitrogenados utilizados a nivel mundial (Anderson *et al.*, 2002; Glibert *et al.*, 2006). La escorrentía de zonas agrícolas y urbanas ha contribuido

considerablemente al aumento de nitrógeno orgánico en los ríos (Glibert *et al.*, 2006; Solomon *et al.*, 2010). Se ha observado un incremento sostenido, superior a 5 μM en las concentraciones de NH_4^+ o urea en estuarios alrededor del mundo, y en algunos casos, valores promedios mensuales similares o mayores a 30 μM (Glibert *et al.*, 2016). Este fenómeno es relevante debido a que la urea puede ser rápidamente hidrolizada en NH_4^+ , un nutriente que promueve el crecimiento de especies productoras de FANs (Solomon *et al.*, 2010; Glibert *et al.*, 2006).

En el ecosistema patagónico chileno, especialmente en bahías y estuarios, las principales influencias antropogénicas provienen del turismo, la silvicultura y la acuicultura, lo que contribuye a una abundante presencia de materia orgánica en descomposición (Anderson *et al.*, 2002; Iriarte *et al.*, 2023). En particular, la acuicultura se ha convertido en una fuente creciente de nitrógeno reducido, principalmente NH_4^+ y urea, derivados de la excreción directa de los peces en cultivo y de la remineralización del alimento no consumido (Bouwman *et al.*, 2013).

1.3 *Heterosigma akashiwo*

Dentro de las especies de microalgas que forman FANs, se encuentra la rafiidófica marina *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada ex Hara & Chihara (1987), anteriormente clasificada como *Olisthodiscus carterae* (Hulbur, 1965).

Este es un organismo unicelular perteneciente a la clase Raphidophyceae, que forma parte del fitoplancton marino. Su longitud oscila entre 12 y 34 μm , con un espesor de 8 a 10 μm . Este organismo muestra pleomorfismo, lo que implica que su forma puede variar desde esferoidal a ovoide u oblongo (Hara & Chihara, 1987); carece de pared celular y está limitado únicamente por una membrana (Honjo, 1992). Su color varía entre tonos amarillos y marrones amarillentos. Presenta dos flagelos heterodinámicos: uno anterior utilizado para la locomoción y el movimiento, y otro posterior rígido (Hara & Chihara, 1987). Esta adaptación permite que *H. akashiwo* se desplace de forma espiralada, favoreciendo así su movilidad en el agua (Hara & Chihara, 1987). Antes del amanecer, las células de *H. akashiwo* migran verticalmente desde las capas inferiores del medio acuático hasta la superficie, y descienden nuevamente hacia las profundidades justo antes del anochecer (Kohata *et al.*, 1986). Esta estrategia de migración desempeña un papel importante en el desarrollo y la formación de FANs (Shitaka *et al.*, 2015).

Las células de *H. akashiwo* pueden contener de 10 a 25 cloroplastos discoides de color amarillo-marrón, los cuales se ubican en la región periférica de la célula (Hara & Chihara, 1987). El número de cloroplastos varía dependiendo de diversos factores, entre ellos: la etapa de crecimiento, irradiancia, fotoperíodo y la disponibilidad de nutrientes (Smayda, 1998). La composición de pigmentos de *H. akashiwo* incluye Chl a, Chl c1, Chl c2, carotenos como β -caroteno y xantófilas como la fucoxantina, entre otras

(Martínez *et al.* 2010). En condiciones de intensa irradiancia y estrés ambiental, se activa el ciclo de las xantofilas (violaxantina, anteraxantina y zeaxantina), que permite proteger a la célula del daño oxidativo, causado por el exceso de luz y especies reactivas de oxígeno (ROS), al mismo tiempo que mejora la eficiencia fotosintética en respuesta a los cambios ambientales (Goss *et al.*, 2006; Larkum *et al.*, 2020).

1.4 Registro de FANs de *Heterosigma akashiwo* en el mundo

La rafidófica *Heterosigma akashiwo* es una especie cosmopolita, conocida por su capacidad para desencadenar proliferaciones intensas y extensas en verano, las cuales pueden persistir durante semanas o meses (Hara & Chihara, 1987; Taylor & Haigh, 1993). Esta especie se encuentra comúnmente en regiones marinas templadas alrededor del mundo, con registros de su presencia en países como Canadá (Taylor & Haigh, 1993), Estados Unidos (Kempton *et al.*, 2008), Japón (Hara & Chihara, 1987), Nueva Zelanda (Chang *et al.*, 1990), España (Martínez *et al.*, 2010), Sudáfrica (Bornman *et al.*, 2022) y Chile (Mardones *et al.*, 2012; Ugarte *et al.*, 2022). De manera excepcional, también se ha reportado tan al norte como el Mar de Bering frente a la península de Kamchatka (Rusia) e incluso en aguas árticas (Engesmo *et al.*, 2016).

En Chile, el primer episodio documentado de mortalidad de salmones causado por *H. akashiwo* ocurrió en septiembre de 1988 en la Región de Los Lagos, específicamente en el Seno de Reloncaví, Hornopirén e Isla de Chiloé. Durante este evento, se observó una densidad celular máxima de hasta 100.000 células mL⁻¹ (Parra *et al.*, 1991). Desde entonces, *H. akashiwo* ha sido ocasionalmente identificado en muestras de agua de mar asociadas a mortalidades de salmones enjaulados en los años 2000, 2002 y 2011 (Mardones *et al.*, 2012). En abril de 2021, se produjo una floración masiva de *H. akashiwo* en el fiordo Comau, ubicado en el norte de la Patagonia chilena. Durante esta floración, la abundancia celular alcanzó 210.000 células mL⁻¹, lo que resultó en una mortalidad estimada en 5.000 toneladas de salmones de cultivo (Mardones *et al.*, 2023). La floración más reciente de *H. akashiwo* ocurrió en abril de 2024, en la zona de Hornopirén, Isla Pelada y canal Cholgo. En este episodio, se registró una concentración máxima de 55.000 células mL⁻¹, con consecuencias que incluyeron la pérdida de 288 toneladas de salmónidos (<https://centroideal.cl/2024/04/27/detectan-nueva-floracion-nociva-en-los-fiordos-de-la-patagonia/> y <https://www.cr2.cl/detectan-nueva-floracion-nociva-en-los-fiordos-de-la-patagonia-radio-festival/>).

La amplia distribución de *H. akashiwo* puede atribuirse a las actividades de navegación que podrían transportar quistes viables de esta especie en los tanques de agua de lastre de los barcos, además, esta especie tiene capacidad

para adaptarse a una amplia gama de entornos, atribuida en parte a sus características euritérmicas y eurihalinas (Imai *et al.*, 1993; Smayda *et al.*, 1998).

1.5 Mecanismos ictiotóxicos de *H. akashiwo*

Heterosigma akashiwo, es una especie de rafdófica ictiotóxica, que ha sido fuertemente vinculada a eventos de mortalidad de peces de jaulas y silvestres, en diversas regiones costeras del mundo (Chang *et al.*, 1990; Taylor & Haigh, 1993; Kempton *et al.*, 2008; Matheson *et al.*, 2014). Estas floraciones generan incertidumbre debido a que persiste la falta de claridad respecto a sus mecanismos ictiotóxicos. Hasta el momento se han reconocido 4 posibles vías ictiotóxicas: **1)** Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Yang *et al.*, 1995; Oda *et al.*, 1997) **2)** Secreción de mucus que cubre las branquias de los peces (Chang *et al.*, 1990) **3)** Producción de compuestos neurotóxicos similares a las brevetoxinas (Khan *et al.*, 1997; Haque & Onoue, 2002) y **4)** Compuestos hemolíticos que lisan los glóbulos rojos (Ling & Trick, 2010).

1.6 Efecto de la fuente de nitrógeno (NO_3^- , NH_4^+ y urea) en algas nocivas

En los ecosistemas costeros, especialmente en zonas estuarinas, el nitrógeno (N) desempeña un papel fundamental como uno de los principales macronutrientes que limita la productividad del fitoplancton (Anderson *et al.*,

2002). Este nutriente es aportado frecuentemente por la entrada de agua dulce, la cual transporta nitrógeno en formas orgánicas e inorgánicas desde los sistemas terrestres hacia las zonas costeras, contribuyendo a la formación de gradientes espaciales de nutrientes característicos de estos ambientes (Iriarte *et al.*, 2014). La forma orgánica comprende la urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$), aminoácidos libres, y N particulado, mientras que las formas inorgánicas incluyen nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+) (Antia *et al.*, 1991). Se ha sugerido que las diferentes formas de nitrógeno disponibles influyen en el desarrollo y toxicidad de las especies productoras de FANs (Gilbert *et al.*, 2016).

Se ha observado la preferencia por el nitrógeno reducido (e.g. NH_4^+), en diversos grupos de fitoplancton nocivo, particularmente en dinoflagelados, lo cual se ha demostrado, por ejemplo, en *Alexandrium sp.* y *Prorocentrum minimum* (Lomas & Glibert, 1999; Fan *et al.*, 2003; Maguer *et al.*, 2007). De manera similar, las diatomeas también muestran una mayor utilización de NH_4^+ por sobre el NO_3^- , como se ha evidenciado en especies tales como *Pseudo-nitzschia australis* y *Skeletonema sp.* (Jit *et al.*, 2009; Tada *et al.*, 2010). No obstante, aunque el NH_4^+ es preferido, se ha observado que puede ejercer un efecto inhibitorio o represivo sobre la captación de NO_3^- en algunas especies de fitoplancton, afectando la dinámica de asimilación del nitrógeno (Dortch, 1990; Maguer *et al.*, 2007; L'Helguen *et al.*, 2008).

Por otra parte, la urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) también juega un papel importante en la proliferación de especies de microalgas nocivas (Glibert *et al.*, 2006). En general, se ha observado que varias especies pueden crecer en urea (Neilson *et al.*, 1980; Cucchiari *et al.*, 2008) alcanzando incluso tasas de crecimiento superiores a las de NH_4^+ y NO_3^- (Cucchiari *et al.*, 2008; Solomon *et al.*, 2010; Erratt *et al.*, 2020).

En el caso específico de cepas de *H. akashiwo*, en general, se ha observado una preferencia por formas reducidas como el NH_4^+ entre las formas de nitrógeno disponibles (NO_3^- , NH_4^+ y urea) (Herndon & Cochlan (2007); Ji *et al.*, 2020). Esta preferencia puede atribuirse al menor gasto energético requerido para la asimilación celular en comparación con otras formas de N oxidado (Gilbert *et al.*, 2016). Sin embargo, estudios como el de Matheson *et al.* (2014) han encontrado que el NO_3^- promueve una tasa de crecimiento significativamente mayor que NH_4^+ o urea. Además, en el estudio de Herndon & Cochlan (2007), bajo condiciones de baja irradiancia ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), tanto el NH_4^+ como la urea promovieron tasas de crecimiento superiores al NO_3^- .

Hasta la fecha, no hay antecedentes que examinen la relación entre la fuente de nitrógeno y la toxicidad de *H. akashiwo*. Únicamente Matheson *et al.*, (2014), analizaron el crecimiento celular en distintas fuentes de nitrógeno (NH_4^+ , NO_3^- y urea) y realizaron un ensayo con células branquiales de trucha arcoíris (RTgill-W1) empleando concentraciones creciente de NO_3^- , observándose una

fuerte correlación positiva entre la toxicidad y la concentración de nitrógeno, y una toxicidad máxima (mayor al 90%) a concentraciones iguales o superiores a 1,40 mg L⁻¹ de N.

1.7 Efecto de la salinidad en *H. akashiwo*

Los efectos fisiológicos de la salinidad en la microalga *H. akashiwo* son de particular interés debido al aumento de escorrentía de agua dulce derivada del rápido retroceso de los campos de hielo en las regiones australes (Weidemann *et al.*, 2020). En el sur de Chile, esta interacción entre el agua dulce continental y el agua salada oceánica, crea un sistema de circulación estuarina en áreas como la Boca del Guafo, el Golfo de Penas y el Canal Concepción, en las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes (Ugarte *et al.*, 2022). Estas zonas exhiben marcados gradientes verticales y horizontales de salinidad y temperatura, los cuales influyen en la productividad biológica, la biomasa y la estructura de la comunidad fitoplanctónica (Iriarte *et al.*, 2014).

La salinidad se ha identificado como un factor influyente en el desarrollo de proliferaciones nocivas de *H. akashiwo*, debido a su impacto en el crecimiento y la toxicidad de esta microalga (Haque & Onoue, 2002; Strom *et al.*, 2013). *Heterosigma akashiwo*, es conocida por su capacidad eurihalina, exhibiendo tolerancia a un amplio rango de salinidades, desde 2 hasta más de 50 PSU (Taylor & Haigh, 1993; Smayda, 1998). Una de las estrategias

empleadas por *H. akashiwo* para contrarrestar el estrés asociado con la disminución de la presión de turgencia debido a la reducción de la salinidad, es la modificación de la permeabilidad de su membrana (Ikeda *et al.*, 2016). Debido a que esta especie no posee una pared celular rígida (Honjo, 1992), se ha sugerido que la elasticidad de su membrana celular le permite regular la presión de turgencia sin dañar su estructura celular (Phillip, 1958).

Estudios previos indican que la tasa de crecimiento de *H. akashiwo* se ve favorecida en salinidades iguales o menores a 25 PSU (Haque & Onoue, 2002; Kempton *et al.*, 2008; Ikea *et al.*, 2016; Sandoval-Sanhueza *et al.*, 2022), las cuales además potenciarían su toxicidad (Haque & Onoue, 2002; Ikea *et al.*, 2016; Sandoval-Sanhueza *et al.*, 2022). Por ejemplo, células de *H. akashiwo* cultivadas a una salinidad de 20 PSU, resultaron ser altamente tóxicas para la línea celular de embrión de salmón Chinook, a una muy baja densidad celular (20 células mL⁻¹) (Sandoval-Sanhueza *et al.*, 2022). En el caso de Gómez *et al.* (2022) observaron que distintas cepas de *H. akashiwo* cultivadas a una salinidad de 15 PSU, también resultaron tóxicas (bioensayo con *Artemia salina*) a una densidad celular relativamente baja (< 3806 células mL⁻¹). En concordancia con lo anterior, en el estudio de Flores-Leñero *et al.* (2022), lisados celulares de *H. akashiwo* cultivada a una salinidad de 27 PSU, necesitaron de una densidad celular mayor (47.000 células mL⁻¹) para provocar efectos tóxicos significativos en un modelo de células branquiales de peces (RTgil-W1). Estos resultados destacan la importancia de la salinidad como un

factor clave en la toxicidad de *H. akashiwo* y respaldan la idea de que esta especie puede iniciar floraciones en ambientes de baja salinidad, donde mantiene tasas de crecimiento cercanas al máximo y enfrenta una menor presión de depredación (Strom *et al.*, 2013).

1.8 Desempeño fotosintético en microalgas

La disponibilidad de luz es uno de los factores más importantes para los ambientes marinos, ya que promueve la actividad fotosintética. Las microalgas poseen un sistema fotosintético altamente adaptable que les permite ajustarse a condiciones variables de luz (Ihnken *et al.*, 2010); sin embargo, cuando la irradiancia es excesiva puede causar diferentes niveles de fotoinhibición (Franklin *et al.*, 1997).

La fotoinhibición puede ser de dos tipos: dinámica o crónica. La fotoinhibición dinámica es un proceso reversible a corto plazo, que permite a las microalgas disipar el exceso de energía luminosa mediante la disipación térmica del exceso de fotones (Demmig-Adams & Adams, 1992). Por otro lado, la fotoinhibición crónica es un proceso más lento y menos reversible, asociado a la pérdida funcional del aparato fotosintético tras una exposición prolongada a altos niveles de irradiancia (Demmig-Adams y Adams, 1992; Osmond & Grace, 1995)

Para comprender la dinámica fotosintética de las microalgas, se han desarrollado diversas técnicas. Entre ellas, la fluorescencia *in vivo* de la clorofila

a, medida a través de fluorímetros de pulsos de amplitud modulada (PAM), proporciona información importante sobre la eficiencia fotosintética y las estrategias fisiológicas de aclimatación de las microalgas (Schreiber *et al.*, 2002). Los parámetros obtenidos con el PAM no sólo son útiles para determinar los niveles óptimos de irradiancia en experimentos con microalgas, sino también para comprender su respuesta a diversos factores de estrés ambiental, como la exposición intensa a la luz, disponibilidad de nutrientes, contaminantes, y estrés oxidativo en general (Franklin *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 2019; Choi *et al.*, 2012; Drábková *et al.*, 2007;). Además, esta herramienta también ha sido utilizada en estudios de toxicidad (Schreiber *et al.*, 2002).

Los estudios que abordan la fotobiología en microalgas nocivas son cada vez más frecuentes (Sun *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2021); en el caso de *H. akashiwo*, estos estudios están aportando al esclarecimiento de los mecanismos que promueven su proliferación (Gao *et al.*, 2007; Hennige *et al.*, 2013; Gómez *et al.*, 2022).

1.9 Variabilidad intraespecífica en *H. akashiwo*

Los estudios sobre *H. akashiwo* han revelado la existencia de una notable diversidad fenotípica, evidenciando que cepas de distinto origen geográfico muestran diferencias en su morfología, atributos fisiológicos y toxicidad, al ser cultivadas en una misma condición ambiental (Han *et al.*, 2002;

Martínez *et al.*, 2010; Fredickson *et al.*, 2011; Harvey *et al.*, 2015; Gómez *et al.*, 2022). Estos hallazgos son importantes ya que explicarían, en parte, la falta de modelos predictivos confiables para predecir FANs de esta especie. En contraste con lo anterior, varios estudios genéticos han mostrado que esta especie posee una baja variabilidad genética a nivel intraespecífico, evidenciada por la homogeneidad de las secuencias de ADN ribosomal, incluidas regiones genéticamente variables como los espaciadores ribosomales internos transcritos (ITS) (Connell, 2000; Bowers *et al.*, 2006; Engesmo *et al.*, 2016). Estas evidencias, aparentemente contradictorias, indican que se requieren estudios comparativos de otras regiones del genoma para establecer conclusiones más robustas sobre la variabilidad genética a nivel intraespecífico en *H. akashiwo*.

Estos descubrimientos destacan la necesidad de investigar más a fondo la variabilidad dentro de la especie *H. akashiwo* para comprender mejor su capacidad de adaptación y su comportamiento nocivo en el ambiente.

1.10 Evaluación de la toxicidad de *H. akashiwo* utilizando *Danio rerio* como modelo biológico

El pez cebra (*Danio rerio*), nativo del sudeste asiático, se ha consolidado como uno de los modelos experimentales más relevantes en toxicología acuática y biología del desarrollo. Su amplia utilización se debe a un conjunto de

características tales como, su pequeño tamaño, la transparencia y rápido desarrollo de los embriones, su alta fecundidad y la facilidad para mantenerlo y manipularlo en condiciones de laboratorio (Della torre *et al.*, 2022). Estas cualidades permiten mantener un seguimiento detallado y continuo de los procesos ontogenéticos, tanto en condiciones normales como bajo la exposición a distintos agentes tóxicos.

En toxicología, *Danio rerio* destaca por su estrecha relación genética con otros vertebrados, incluido los mamíferos, además de presentar una alta similitud genómica con el ser humano lo que permite extrapolar con mayor certeza los efectos observados (Moreno *et al.*, 2013). Asimismo, la disponibilidad de líneas transgénicas y mutantes facilita el estudio de rutas metabólicas y mecanismos de acción de distintos tóxicos. Además, su uso permite integrar análisis moleculares, morfológicos y conductuales durante el desarrollo temprano, proporcionando un modelo sensible para detectar efectos subletales y alteraciones sutiles que otros modelos no siempre evidencian (de Esch *et al.*, 2012).

Un aspecto regulatorio importante es la directiva europea (2010/63/UE), que establece que los embriones y larvas de pez cebra anteriores a los 5 días post fertilización (dpf) no se consideran animales en términos éticos y legales. Por ello, los estudios realizados en estos estadios constituyen una alternativa aceptada para los ensayos convencionales que involucran organismos

vertebrados superiores, contribuyendo al cumplimiento de las directrices de reemplazo, reducción y refinamiento en investigación (Strähle *et al.* 2012)

La alta sensibilidad, rápido desarrollo y capacidad para revelar efectos tanto letales como subletales del *D. rerio* ha conducido a su uso en estudios con metales pesados, pesticidas, fármacos y toxinas marinas, destacando su potencial para detectar alteraciones fisiológicas y celulares incluso a bajas concentraciones (Berry *et al.*, 2007; Tian *et al.*, 2019; Porretti *et al.*, 2022; Llanos-Rivera *et al.*, 2023; Manna y Firdous, 2025).

En esta investigación se estudió el efecto combinado de dos factores relevantes en la dinámica de las FANs: salinidad y fuente de nitrógeno, utilizando como modelos de estudio dos cepas de la rafidofícea ictiotóxica *H. akashiwo* de distinto origen geográfico (Chile y Nueva Zelanda).

La pregunta de investigación planteada fue:

¿Cómo afectan la salinidad y la fuente de nitrógeno al crecimiento y toxicidad de la microalga ictiotóxica *Heterosigma akashiwo*?

Se hipotetiza que la baja salinidad y el NH_4^+ como fuente de nitrógeno promueven el crecimiento y la toxicidad de la microalga ictiotóxica *H. akashiwo*, en una magnitud cepa-dependiente. El NH_4^+ , como fuente de nitrógeno fácilmente asimilable, parece estar directamente relacionado con la proliferación de esta microalga. Asimismo, la baja salinidad se ha asociado con cambios fisiológicos en *H. akashiwo* que favorecen su crecimiento y toxicidad. Por lo

tanto, la combinación de baja salinidad y NH_4^+ podrían actuar sinérgicamente para estimular tanto el crecimiento como la toxicidad de *H. akashiwo*, en una forma cepa-dependiente

2. HIPÓTESIS

El efecto combinado de una baja salinidad y NH_4^+ como fuente de nitrógeno favorece el crecimiento y toxicidad de *Heterosigma akashiwo*, en forma cepa-dependiente

3. OBJETIVO GENERAL: Estudiar el efecto combinado de la salinidad y la fuente de nitrógeno en la proliferación y toxicidad de dos cepas de la microalga ictiotóxica *Heterosigma akashiwo*, de distinto origen geográfico.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar si la salinidad y la fuente de nitrógeno influyen en el crecimiento de dos cepas de *H. akashiwo* de distinto origen geográfico.
2. Evaluar si los atributos fisiológicos de las dos cepas de *H. akashiwo* en estudio cambian frente a condiciones combinadas de salinidad y fuente de nitrógeno.
3. Definir si la salinidad y la fuente de nitrógeno afectan la ictiotoxicidad de las dos cepas de *H. akashiwo* en estudio.

4. METODOLOGÍA

4.1 Material biológico

En este estudio se emplearon dos cepas de *H. akashiwo*:

-Cepa CCM-UdeC 279 (=CCMP 302, Nueva Zelanda), obtenida del Centro Nacional de Cultivo de Fitoplancton Marino Provasoli-Guillard, Maine, EE. UU. Aislada en el año 1984 a partir de una muestra recolectada de Millford Sound, Nueva Zelanda.

-Cepa CCM-UdeC 225, aislada de una muestra de agua de mar recolectada durante un evento FAN en el Estuario Maullín (41°33.650'S, 73°30.007'W), Región de Los Lagos, Chile, en abril de 2013.

Además, se utilizó una cepa de *Tetraselmis tetrathele* como control en los bioensayos de toxicidad:

-Cepa CCM-UdeC 226 (=CCAP 66/40, Estados Unidos)

Todas las cepas se encuentran depositadas en la Colección de Cultivo de Microalgas, CCM-UdeC, de la Universidad de Concepción.

4.2 Condiciones de cultivo

Las cepas se cultivaron en matraces erlenmeyer de 250 mL con 200 mL de medio L1 (Guillard & Hargraves, 1993). Se estableció un total de nueve tratamientos combinando tres niveles de salinidad (15, 25, 35 PSU) y tres fuentes de nitrógeno (NH_4^+ , NO_3^- y $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$). Cada tratamiento con las diferentes fuentes de nitrógeno contuvo el equivalente a la cantidad de nitrógeno elemental que contiene el medio L1 (12.3 mg L^{-1}). Para lograr los distintos tratamientos de salinidad se procedió de la siguiente manera: se determinó la salinidad del agua de mar que se utilizó para preparar el medio de cultivo y se diluyó con agua destilada para alcanzar una salinidad de 15 PSU. Posteriormente, se ajustaron las salinidades a 25 y 35 PSU de los demás tratamientos de salinidad mediante la adición de cloruro de sodio (NaCl) (**Figura 1**).

Los matraces se incubaron en una sala de cultivo a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, con una irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 16:8 (L:O), sin aireación, pero con agitación manual una vez al día. Los cultivos se iniciaron con una densidad de $1.000 \text{ células mL}^{-1}$ utilizando células en fase de crecimiento exponencial aclimatadas durante 18 días a las condiciones experimentales. Se establecieron 4 réplicas de cada cepa en cada tratamiento, las cuales se emplearon para preparar los extractos utilizados para evaluar la toxicidad.

Además, para disponer de un extracto control de una microalga no tóxica en los ensayos de toxicidad, se estableció un cultivo de *T. tetrahele* en medio Walne (Walne *et al.*, 1970) con nitrato como fuente de nitrógeno, en matraces de 250 mL, el cual contenía 200 ml de medio de cultivo. El cultivo se inició con una densidad de 10.000 células mL⁻¹ utilizando células en fase de crecimiento exponencial aclimatadas durante 18 días a las condiciones experimentales.

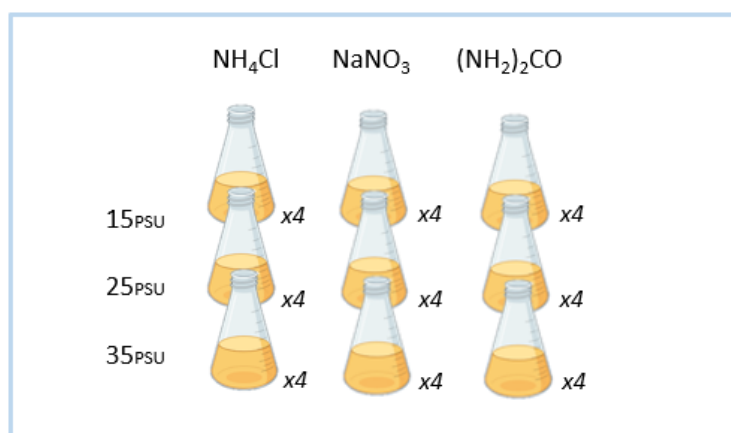


Figura 1 Tratamientos a evaluar con las dos cepas de *H. akashiwo* en estudio.

4.3 Análisis de crecimiento

Se determinaron las curvas de crecimiento de las dos cepas de *H. akashiwo* cultivadas en los 9 tratamientos de salinidad y fuente de nitrógeno. Los recuentos celulares se realizaron día por medio en cámaras de recuento Utermöhl de 1 mL en las cuatro réplicas de cada tratamiento. El crecimiento se controló hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial. La tasa de

crecimiento, K_{\max} (divisiones día⁻¹) se determinó durante la fase de crecimiento exponencial según Guillard (1973). Se registró también la densidad celular máxima alcanzada por los cultivos.

4.4 Fluorimetría de amplitud modulada por pulsos (PAM)

Los parámetros fotoquímicos se determinaron al finalizar la fase exponencial de los cultivos (10 días). Los parámetros de fluorescencia se realizaron utilizando un fluorómetro junior PAM con LED de medición azul (Walz, Alemania). El software WinControl se utilizó para la transferencia de datos, el análisis de datos y el control remoto del instrumento.

Las muestras se analizaron en una cubeta oscura, homogeneizando manualmente el cultivo previo a cada medición para mantener las células en suspensión. Antes de las mediciones, las muestras fueron incubadas en oscuridad durante 20 minutos para asegurar la apertura completa de los centros de reacción del fotosistema II (PSII). Tras el periodo de aclimatación, se registró la fluorescencia mínima o basal (F_0 , todos los centros de reacción abiertos). Posteriormente, la fluorescencia máxima (F_m , todos los centros de reacción cerrados) se indujo mediante un pulso de luz saturante (aproximadamente 1500 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$). La variable fluorescencia (F_v) se obtuvo como: $F_v = F_m - F_0$. A partir de estos valores se estimó el rendimiento cuántico óptimo del fotosistema II (F_v/F_m) calculado como $(F_m - F_0)/F_m$.

Posteriormente, se realizaron curvas rápidas de luz (Rapid Light Curves, RLC) para evaluar la respuesta fotoquímica del PSII frente a incrementos de irradiancia. Durante este procedimiento, las muestras fueron expuestas a irradiancias crecientes de luz actínica emitidas por el fluorómetro (66, 99, 125, 199, 285, 420, 625, 845, 1150 y 1500 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$). En cada nivel de irradiancia, las células fueron expuestas durante 20 segundos a luz actínica. Posteriormente se aplicó un pulso saturante para determinar la fluorescencia máxima bajo luz (F_m').

La Extinción No Fotoquímica (NPQ; del inglés Non-Photochemical Quenching) se calculó utilizando los valores de fluorescencia obtenidos mediante el procedimiento RLC de acuerdo al modelo tangencial propuesto por Eilers & Peeters (1988):

$$\text{NPQ} = (F_m - F_m') / F_m'$$

Donde F_m corresponde a la fluorescencia máxima registrada tras la aclimatación a la oscuridad y F_m' , corresponde a la fluorescencia máxima obtenida bajo cada intensidad de luz durante la curva rápida de luz.

4.5 Análisis de pigmentos

Los pigmentos se determinaron al finalizar la fase exponencial de los cultivos (día 10). El contenido de clorofilas (a y c) y los carotenoides totales se determinó mediante espectrofotometría. Se filtraron 10 a 15 mL de cultivo a

través de filtros de membrana de éster de celulosa mixta con un tamaño de poro de 0,45 μm (MF Millipore, Merck, Alemania). Los filtros conteniendo las células se congelaron inmediatamente a -20°C . Los pigmentos se extrajeron en forma cuantitativa con una mezcla de acetona/agua al 90% (v/v) aforando el volumen total de extracto a 2 mL. La determinación espectrofotométrica de clorofila a, c y carotenoides totales se realizó como en Wegmann & Metzner, (1971).

4.6 Preparación de los extractos de *H. akashiwo* para los bioensayos en peces

Para cada condición experimental se colectaron 25×10^6 células de *H. akashiwo* mediante centrifugación a 4°C a 4500 rpm durante 10 min. El pellet resultante se resuspendió en 900 μl de medio E3 (5 mM de NaCl; 0.17 mM de KCl; 0,33 mM de CaCl_2 y 0,33 mM de MgSO_4 preparado en agua destilada, según la metodología de Llanos-Rivera *et al.*, 2023) y luego las células fueron lisadas con una esfera de cerámica (de 6,3 mm de tamaño recubierta con óxido de circonio) en el homogeneizador automático Fastprep-24, durante 3 ciclos de 20 seg. Posteriormente, el lisado celular fue centrifugado a 10000 rpm durante 5 min, y el sobrenadante resultante se trasladó a un matraz aforado de 5 mL. Este procedimiento se repitió tres veces, adicionando medio y realizando nuevamente la molienda y centrifugación, para finalmente completar a 5 mL el volumen del matraz con medio E3. Esta solución se utilizó como el extracto de *H. akashiwo* (al 100%) en los bioensayos de toxicidad con el pez cebrá.

Se realizó el mismo procedimiento para obtener el extracto de *Tetraselmis tetraathele*, utilizado como control negativo, colectándose también 25×10^6 células, lisándolas y llevando el extracto con medio E3 a un volumen de 5 mL (extracto al 100%). Todos los extractos fueron alicuotados y almacenados a -80°C hasta su uso.

4.7 Mantenimiento de *Danio rerio* y recolección de huevos

Para la obtención de huevos fertilizados, los peces cebra (machos y hembras de la línea Tab5) se criaron en condiciones estándar en el Laboratorio de Toxicología Acuática de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción. Estas condiciones incluyeron un fotoperíodo de 14:10 (L:O) y una temperatura de $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Los peces fueron alimentados 2 veces al día con alimento comercial (Zebrafeed Sparos). Una vez desovados, los huevos fertilizados destinados a los bioensayos se colocaron en placas de Petri con medio E3 y se mantuvieron a $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ en una cámara de cultivo.

4.8 Ensayo preliminar de toxicidad de *Danio rerio* (pez cebra) frente a extractos de *H. akashiwo*

El ensayo se realizó en placas de 48 pocillos con un volumen total de 300 μL por pocillo. Las pruebas preliminares consistieron en probar distintas concentraciones de un extracto de la cepa CCM-UdeC 225 de *H. akashiwo* cultivada en medio L1 con nitrato como fuente de nitrógeno. Se incluyeron dos

controles negativos: medio E3 y extracto de *T. tetrahele* (**Tabla 1**). Cada tratamiento incluyó 3 réplicas con 5 huevos cada una, en fase de gastrulación, la cual ocurre entre 5 a 6 horas post fertilización (hpf), a una temperatura de incubación de 27 ± 1 °C.

Siguiendo la metodología descrita en Llanos-Rivera *et al.* (2023), los huevos se monitorearon para determinar: (a) porcentaje de mortalidad hasta 48 horas post exposición (hpe) cuando el desarrollo embrionario ha terminado; (b) porcentaje de éxito de eclosión a las 72 hpe; y (c) la presencia de anomalías en las larvas a las 72 hpe. Se consideró que una larva con saco vitelino está viva cuando se observa latido cardíaco.

Tabla 1. Tratamientos preliminares con extractos de *H. akashiwo* (*H.a*) y *T. tetrahele* (*T.t*) en pocillos de 300 ul de volumen total, conteniendo 5 huevos de *D. rerio* en etapa de gastrulación. N=3.

Pocillo	Volumen Extracto	Volumen medio E3
1	75 ul de <i>H.a</i> (25%)	225 ul
2	150 ul de <i>H.a</i> (50%)	150 ul
3	188 ul de <i>H.a</i> (62,5%)	112 ul
4	225 ul de <i>H.a</i> (75%)	75 ul
5	263 ul de <i>H.a</i> (87,5%)	37 ul
6	300 ul de <i>H.a</i> (100%)	0 ul
7	300 ul de <i>T.t</i> (100%)	0 ul
8	0 ul	300 ul

Posteriormente, y con el objeto de ajustar las concentraciones del extracto a utilizar en los ensayos definitivos se realizó un segundo bioensayo preliminar. Se incluyeron dos controles negativos: medio E3 y extracto de *T.*

tetrathele al 100%. El extracto de *H. akashiwo* se evaluó en concentraciones del 10, 15, 20, 25, 30 y 35%, en pocillos de 1 mL de volumen total y con 5 huevos de *D. rerio* en fase de gastrulación en cada uno. En este caso se incluyeron 6 réplicas de cada tratamiento.

Se determinó el % de mortalidad (48 hpe), el % de eclosión (72 hpe) y la presencia de anomalías en las larvas eclosionadas de *D. rerio* (72 hpe) (Llanos-Rivera *et al.*, 2023).

4.9 Evaluación de toxicidad de cepas de *H. akashiwo* cultivadas en distintas salinidades y fuentes de nitrógeno mediante bioensayo con *Danio rerio*

Del ensayo anterior se seleccionó una concentración de extracto de *H. akashiwo* para evaluar la toxicidad de los distintos extractos obtenidos en los 9 tratamientos de salinidad y fuente de nitrógeno, de cada una de las cepas.

Se incluyeron dos controles negativos: medio E3 y *T. tetrathele* a la misma concentración seleccionada para *H. akashiwo*. Los ensayos se realizaron en pocillos de 1 mL de volumen total. Cada tratamiento incluyó 6 réplicas con 5 huevos en fase de gastrulación cada una.

Se determinó el % de mortalidad (48 hpf), el % de eclosión (72 hpf) y la presencia de anomalías en las larvas eclosionadas de *D. rerio* (72 hpf) (Llanos-Rivera *et al.*, 2023).

4.10 Análisis estadístico

Se comprobó la normalidad de los datos usando la prueba Shapiro-Wilk. Luego, se aplicó un ANOVA de tres vías para analizar la influencia de la salinidad, las fuentes de nitrógeno y la identidad de la cepa en el crecimiento, contenido de pigmentos y parámetros fotobiológicos (Fv/Fm y NPQmax) de *H. akashiwo*. Al identificarse efectos significativos, se realizaron pruebas post hoc con el método de Student-Newman-Keuls. Se consideraron significativas las diferencias con $p \leq 0,05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Statistica 7.

Los datos obtenidos del bioensayo de toxicidad con *Danio rerio*, fueron transformados mediante la función arcoseno de la raíz cuadrada (arcsinx). Posteriormente, los datos fueron evaluados mediante la prueba de normalidad Shapiro-Wilk. Dado que los datos no cumplieron con el supuesto de normalidad, se aplicó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de un análisis post hoc de Dunn para comparaciones múltiples. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con valores de $p \leq 0,05$. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism.

5. RESULTADOS

5.1 Crecimiento

El análisis de varianza (ANOVA) realizado para la densidad celular máxima de *H. akashiwo* cultivada en las 9 condiciones de cultivo, mostró que esta variable respuesta, fue afectada significativamente por los tres factores (cepa, fuente de N y salinidad), tanto cuando su efecto se analizó individualmente como combinado (interacción). De los tres factores, el que más influyó en la densidad celular máxima alcanzada en los cultivos de *H. akashiwo*, fue la fuente de N (mayor valor F, **(Figura 17A, en ANEXO)**, seguido de la salinidad y finalmente la cepa.

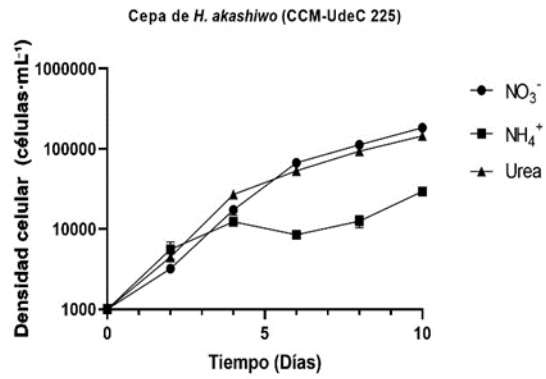
Para la tasa de crecimiento K (div. día⁻¹) el ANOVA de tres vías indicó que esta variable también fue afectada significativamente por los tres factores (cepa, fuente de N y salinidad), tanto cuando su efecto se analizó individualmente como en interacción. En este caso, el factor con mayor efecto en la tasa de

crecimiento de *H. akashiwo*, fue la cepa (mayor valor F, **Figura 18A**) seguida de la fuente de N y la salinidad.

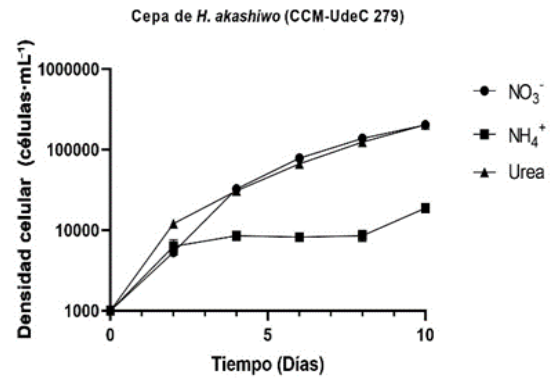
En la cepa chilena (CCM-UdeC 225) de *H. akashiwo*, se registraron las máximas tasas de crecimiento en los tratamientos con NH_4^+ a 25 PSU (1,38 divisiones día⁻¹) y urea a 35 PSU (1,31 divisiones d⁻¹), sin diferencias significativas entre los tratamientos. En contraste, las menores tasas de crecimiento se registraron en los tratamientos con NH_4^+ a 35 PSU y NO_3^- a 15 y 25 PSU. La máxima densidad celular (261.520 células mL⁻¹) se alcanzó en el tratamiento con urea a 25 PSU mientras que las menores densidades celulares, se observaron en el tratamiento con NH_4^+ a 15 PSU, condición en la cual no se alcanzó la densidad celular mínima requerida para la obtención del extracto para los bioensayos en *D. rerio* (**Figura 2, Tabla 2**).

Por otro lado, para la cepa de Nueva Zelanda (CCM-UdeC 279), las mayores tasas de crecimiento se obtuvieron en los tratamientos con urea a 25 y a 15 PSU, alcanzando 1,91 y 1,79 divisiones d⁻¹, respectivamente, sin diferencias significativas entre ambos tratamientos. Mientras que la densidad celular máxima (254.000 células mL⁻¹) se observó en el tratamiento con NO_3^- a 25 PSU. Al igual que para la cepa chilena, las menores densidades celulares se observaron en el tratamiento con NH_4^+ a 15 PSU, en el cual tampoco se alcanzó la densidad mínima requerida para la obtención del extracto para los bioensayos en *D. rerio* (**Figura 2, Tabla 2**).

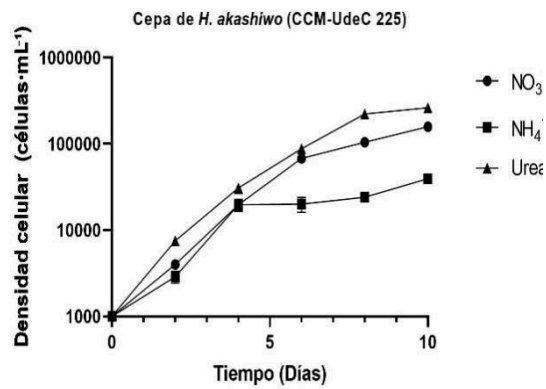
A) 15 PSU



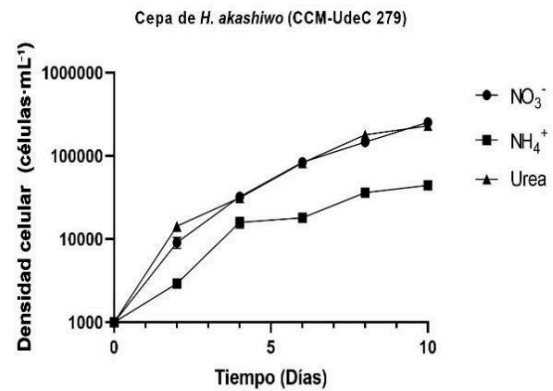
D) 15 PSU



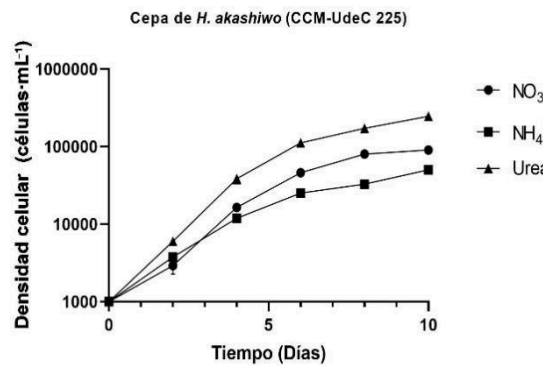
B) 25 PSU



E) 25 PSU



C) 35 PSU



F) 35 PSU

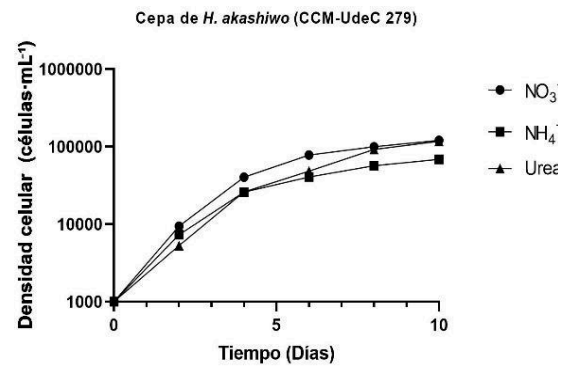


Figura 2. Curvas de crecimiento de *Heterosigma akashiwo* correspondientes a las cepas CCM-UdeC 225 (Chile) (**A, B, C**) y CCM-UdeC 279 (Nueva Zelanda) (**D, E, F**), cultivadas en tres niveles de salinidad (15, 25 y 35 PSU) y tres fuentes distintas de nitrógeno (NH_4^+ , NO_3^- y Urea).

Tabla 2. Tasa de crecimiento K (div. día⁻¹) y densidad celular máxima de las dos cepas de *Heterosigma akashiwo* incluidas en este estudio, cultivadas en tres salinidades y tres fuentes de nitrógeno. n= 4. Letras diferentes como superíndice indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de tres vías, Student Newman Keuls – SNK, p < 0,05).

Cepa	Fuente de nitrógeno	Salinidad	K (div. día ⁻¹)	Densidad celular máxima (x10 ⁴ cél. mL ⁻¹)
CCM-UdeC 225	NH_4^+	15 PSU	1.22 ± 0.18 ^{d.e.f}	2.9 ± 0.14 ^b
CCM-UdeC 225	NO_3^-	15 PSU	1.01 ± 0.01 ^{a.b.c}	18.3 ± 0.47 ^l
CCM-UdeC 225	Urea	15 PSU	1.19 ± 0.02 ^{c.d.e.f}	14.5 ± 0.18 ^h
CCM-UdeC 225	NH_4^+	25 PSU	1.39 ± 0.13 ^{f.g}	4.0 ± 0.38 ^c
CCM-UdeC 225	NO_3^-	25 PSU	1.01 ± 0.01 ^{a.b}	15.8 ± 0.46 ⁱ
CCM-UdeC 225	Urea	25 PSU	1.08 ± 0.01 ^{b.c.d}	26.2 ± 0.39 ^o
CCM-UdeC 225	NH_4^+	35 PSU	0.89 ± 0.04 ^a	5.0 ± 0.43 ^d
CCM-UdeC 225	NO_3^-	35 PSU	1.26 ± 0.12 ^{d.e.f.g}	9.1 ± 0.72 ^f
CCM-UdeC 225	Urea	35 PSU	1.31 ± 0.05 ^{e.f.g}	24.6 ± 0.75 ^m
CCM-UdeC 279	NH_4^+	15 PSU	1.31 ± 0.17 ^{e.f.g}	1.9 ± 0.11 ^a
CCM-UdeC 279	NO_3^-	15 PSU	1.26 ± 0.02 ^{d.e.f.g}	20.2 ± 0.27 ^k
CCM-UdeC 279	Urea	15 PSU	1.79 ± 0.06 ⁱ	20.4 ± 0.72 ^k
CCM-UdeC 279	NH_4^+	25 PSU	1.22 ± 0.12 ^{d.e.f}	4.4 ± 0.27 ^{c.d}
CCM-UdeC 279	NO_3^-	25 PSU	1.59 ± 0.11 ^h	25.4 ± 0.85 ⁿ
CCM-UdeC 279	Urea	25 PSU	1.92 ± 0.10 ⁱ	22.8 ± 0.25 ^l
CCM-UdeC 279	NH_4^+	35 PSU	1.43 ± 0.07 ^g	6.8 ± 0.23 ^e
CCM-UdeC 279	NO_3^-	35 PSU	1.61 ± 0.09 ^h	12.1 ± 0.89 ^g
CCM-UdeC 279	Urea	35 PSU	1.18 ± 0.01 ^{c.d.e}	11.7 ± 0.66 ^g

5.2 Pigmentos

El análisis de ANOVA de tres vías mostró que todas las variables respuesta asociadas al contenido de pigmento en *H. akashiwo* (clorofila a, clorofila c_1+c_2 , carotenoides, expresadas tanto por volumen de cultivo como por célula) estuvieron significativamente influenciados por los tres factores (cepa, fuente de N y salinidad), tanto cuando su efecto se analizó individualmente como combinado (interacción) (**Figura 19A a Figura 24A**), aunque la significancia de estas últimas varió entre las variables respuesta. En particular, la interacción entre los tres factores (cepa, fuente de N y salinidad), no resultó significativa para el contenido de clorofila c_1+c_2 ($\mu\text{g/L}$ cultivo) (**Figura 20A**). Asimismo, para clorofila a (pg/célula) y carotenoides (pg/célula) la interacción entre cepa y salinidad no presentó efectos significativos (**Figura 22A, Figura 24A**).

De los tres factores, la cepa fue el factor que más influyó sobre el contenido de clorofila a clorofila c_1+c_2 y carotenoides, tanto por volumen de cultivo como por célula, seguida de la fuente de nitrógeno y la salinidad (**Figura 19A a Figura 24A**). En contraste, para las clorofilas c_1+c_2 (pg/célula), la fuente de N fue el factor con mayor influencia, seguida de la salinidad y finalmente, la cepa (**Figura 23A**).

Ambas cepas presentaron una mayor acumulación celular de pigmentos (clorofila a, clorofilas c_1 y c_2 , y carotenoides), cuando fueron cultivadas con NH_4^+ a una salinidad de 15 PSU. En contraste los tratamientos con urea se asociaron con menores contenidos celulares de pigmentos, particularmente en la cepa CCM-UdeC 225 a salinidades de 15 y 35 PSU y para la cepa CCM-UdeC 279 a 15 y 25 PSU. En el caso de las clorofilas $c_1 + c_2$, se observaron bajos niveles de acumulación ($< 1 \text{ pg cél}^{-1}$) en todos los tratamientos con urea, independiente de la salinidad, para la cepa CCM-UdeC 225, mientras que la cepa CCM-UdeC 279 únicamente en NH_4^+ a una salinidad de 35 PSU **(Tabla 3)**.

En concentraciones de pigmentos expresados por volumen de cultivo ($\mu\text{g/L}$ cultivo), se observaron diferencias marcadas entre cepas. La cepa CCM-UdeC 279 presentó, en general, mayores concentraciones por volumen de clorofila a y carotenoides, particularmente bajo condiciones de NO_3^- a salinidades de 15 y 25 PSU, superando significativamente a la cepa CCM-UdeC 225 en la mayoría de los tratamientos. Para las clorofilas c_1+c_2 , ambas cepas mostraron mayores concentraciones por volumen de cultivo en condiciones de NO_3^- y urea a 15–25 PSU, mientras que las combinaciones de NH_4^+ a salinidades a 25 y 35 PSU tendieron a asociarse con los valores más bajos **(Tabla 3)**.

Tabla 3. Contenido de clorofilas y carotenoides totales (expresado por volumen de cultivo y por célula), en cultivos de 10 días de las dos cepas de *H. akashiwo* incluidas en este estudio (n=4, ANOVA de tres vías, Student Newman Keuls – SNK, p < 0,05).

Cepa	Fuente N	Salinidad	Clorofila a (µg/L cultivo)	Clorofila c1+c2 (µg/L cultivo)	Carotenoides (µg/L cultivo)	Clorofila a (pg/célula)	Clorofilas c1+c2 (pg/célula)	Carotenoides (pg/célula)	Razón carotenoides/ clorofila a
CCM-UdeC 225	NH ₄ ⁺	15 PSU	410 ± 47.3 ^{abc}	65 ± 9.1 ^{abcd}	249 ± 27.6 ^{ab}	14 ± 1.0 ^g	2 ± 0.2 ^d	8 ± 0.5 ^f	0.61
CCM-UdeC 225	NO ₃ ⁻	15 PSU	874 ± 83.8 ^e	113 ± 5.7 ^{cde}	502 ± 43.2 ^d	5 ± 0.3 ^c	1 ± 0.0 ^{ab}	3 ± 0.1 ^c	0.58
CCM-UdeC 225	Urea	15 PSU	338 ± 15.3 ^{ab}	66 ± 7.9 ^{abcd}	241 ± 11.0 ^{ab}	2 ± 0.1 ^a	0 ± 0.0 ^a	2 ± 0.0 ^{ab}	0.71
CCM-UdeC 225	NH ₄ ⁺	25 PSU	329 ± 61.2 ^{ab}	36 ± 5.6 ^{ab}	199 ± 34.9 ^a	8 ± 1.1 ^{de}	1 ± 0.1 ^{ab}	5 ± 0.6 ^d	0.61
CCM-UdeC 225	NO ₃ ⁻	25 PSU	673 ± 38.3 ^d	36 ± 42.0 ^{ab}	389 ± 23.2 ^c	4 ± 0.1 ^{bc}	0 ± 0.4 ^a	2 ± 0.0 ^{bc}	0.58
CCM-UdeC 225	Urea	25 PSU	844 ± 109.9 ^e	126 ± 18.8 ^{de}	577 ± 66.1 ^e	3 ± 0.4 ^{ab}	0 ± 0.0 ^a	2 ± 0.2 ^{abc}	0.68
CCM-UdeC 225	NH ₄ ⁺	35 PSU	382 ± 43.7 ^{abc}	94 ± 40.4 ^{bcd}	237 ± 31.7 ^{ab}	8 ± 1.0 ^{de}	2 ± 0.8 ^{cd}	5 ± 0.7 ^d	0.62
CCM-UdeC 225	NO ₃ ⁻	35 PSU	278 ± 100.7 ^a	52 ± 14.4 ^{abc}	186 ± 57.6 ^a	3 ± 0.9 ^{ab}	1 ± 0.1 ^{ab}	2 ± 0.5 ^{abc}	0.68
CCM-UdeC 225	Urea	35 PSU	545 ± 44.2 ^c	75 ± 13.6 ^{abcd}	326 ± 22.8 ^{bc}	2 ± 0.1 ^a	0 ± 0.0 ^a	1 ± 0.0 ^a	0.60
CCM-UdeC 279	NH ₄ ⁺	15 PSU	282 ± 13.7 ^a	74 ± 11.4 ^{abcd}	192 ± 9.7 ^a	15 ± 1.0 ^g	4 ± 0.6 ^e	10 ± 1.0 ^g	0.68
CCM-UdeC 279	NO ₃ ⁻	15 PSU	2142 ± 80.3 ⁱ	285 ± 17.6 ^f	1317 ± 53.0 ⁱ	11 ± 0.2 ^f	1 ± 0.0 ^{bc}	7 ± 0.2 ^e	0.61
CCM-UdeC 279	Urea	15 PSU	1403 ± 181.8 ^g	233 ± 14.9 ^f	898 ± 115.1 ^g	7 ± 0.8 ^d	1 ± 0.0 ^{ab}	4 ± 0.5 ^d	0.64
CCM-UdeC 279	NH ₄ ⁺	25 PSU	482 ± 48.8 ^{bc}	39 ± 29.5 ^{abc}	292 ± 30.0 ^{abc}	11 ± 1.2 ^f	1 ± 0.6 ^{ab}	7 ± 0.7 ^e	0.61
CCM-UdeC 279	NO ₃ ⁻	25 PSU	2161 ± 72.1 ⁱ	243 ± 52.6 ^f	1326 ± 32.6 ⁱ	9 ± 0.0 ^{de}	1 ± 0.1 ^{ab}	5 ± 0.1 ^d	0.61
CCM-UdeC 279	Urea	25 PSU	1654 ± 117.5 ^h	225 ± 31.9 ^f	1028 ± 78.2 ^h	7 ± 0.4 ^d	1 ± 0.1 ^{ab}	4 ± 0.2 ^d	0.62
CCM-UdeC 279	NH ₄ ⁺	35 PSU	495 ± 94.5 ^{bc}	17 ± 20.8 ^a	336 ± 54.0 ^{bc}	7 ± 1.5 ^d	0 ± 0.4 ^a	5 ± 0.8 ^d	0.68
CCM-UdeC 279	NO ₃ ⁻	35 PSU	1101 ± 139.3 ⁱ	167 ± 20.0 ^e	669 ± 85.2 ^f	9 ± 0.9 ^e	1 ± 0.1 ^{bc}	6 ± 0.5 ^d	0.61
CCM-UdeC 279	Urea	35 PSU	876 ± 52.3 ^c	95 ± 91.5 ^{bcd}	593 ± 27.5 ^e	8 ± 0.8 ^{de}	1 ± 0.8 ^{ab}	5 ± 0.4 ^d	0.68

5.3 Parámetros fotosintéticos

El análisis de ANOVA de tres vías mostró que las variables respuesta asociadas a los parámetros fotosintéticos: rendimiento cuántico óptimo del fotosistema II

(Fv/Fm) y extinción no fotoquímica máxima de la fluorescencia de la clorofila (NPQmax) en *H. akashiwo* cultivada en las 9 condiciones de cultivo, fueron afectadas significativamente por los tres factores (cepa, fuente de N y salinidad), cuando su efecto se analizó individualmente y en algunos casos, en combinado (interacción). En particular, para Fv/Fm se observó que la interacción cepa y fuente de N; y cepa con salinidad tuvo efecto significativo. Asimismo, para NPQmax, la única interacción que resultó significativa fue la fuente de N con salinidad. Sin embargo, para ninguno de las dos variables respuestas la interacción de los tres factores (cepa, fuente de N y salinidad) presentó efectos significativos.

De los tres factores, el que más influyó sobre la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (Fv/Fm), fue la salinidad (**Figura 25A**) seguido de cepa y la fuente de N.

En ambas cepas (CCM-UdeC 225 y CCM-UdeC 279), los tratamientos con 15 PSU registraron los mayores valores de Fv/Fm (0,64 - 0,74), en comparación con las salinidades de 25 y 35 PSU, a las cuales se obtuvo valores más bajos (0,19 – 0,25) (**Figura 3A y 3B**).

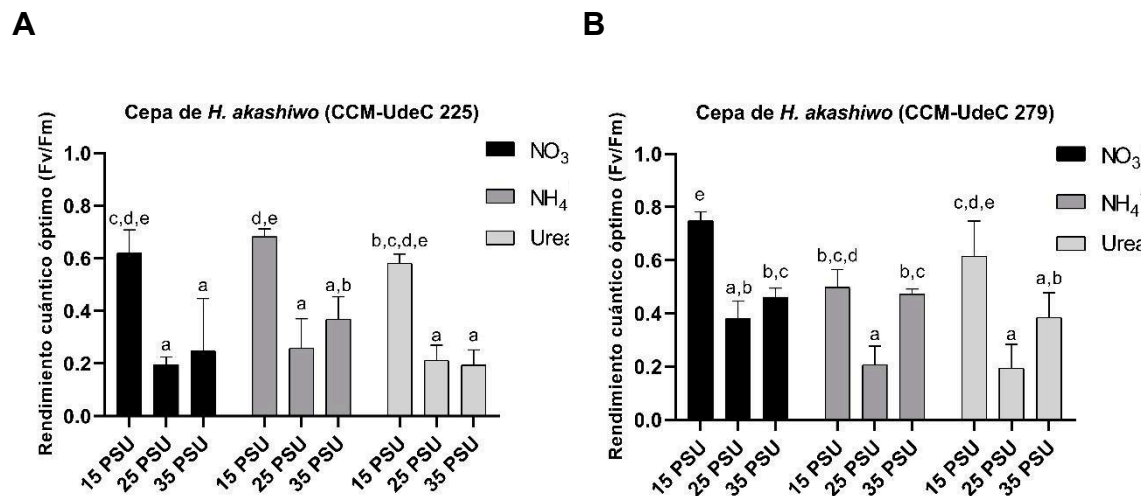


Figura 3. Valores del rendimiento cuántico óptimo del Fotosistema II (Fv/Fm) registrado para la cepa CCM-UdeC 225 **(A)** y la cepa CCM-UdeC 279 **(B)** en sus respectivos tratamientos.

Respecto al parámetro extinción no fotoquímica máxima de la fluorescencia de la clorofila (NPQmax), los resultados del test de ANOVA de tres vías mostraron un efecto significativo mayor de la salinidad, seguido de la fuente de N y la cepa **(Figura 26A)**. Los menores valores de NPQmax (0,06 - 0,90) se registraron principalmente en los tratamientos a 25 PSU, mientras que en 15 PSU se observaron valores bajos e intermedios (0,11- 1,43), lo que indica una activación parcial o moderada del mecanismo NPQmax. En contraste, los valores intermedios y máximos (0.73 – 5.63) se obtuvieron mayoritariamente en los tratamientos a 35 PSU. **(Figura 4A y 3B)**.

Si bien ambas cepas exhibieron un incremento de NPQ_{max} a medida que aumentó la salinidad, tanto en presencia de NH_4^+ como de NO_3^- , la cepa CCM-UdeC 225 alcanzó valores máximos más altos en comparación con la cepa CCM-UdeC 279, siendo la cepa chilena (CCM-UdeC 225) más sensible al estrés salino, mientras que la cepa neozelandesa (CCM-UdeC 279) manifiesta una respuesta fotoprotectora más atenuada en las mismas condiciones (**Figura 4A y B**).

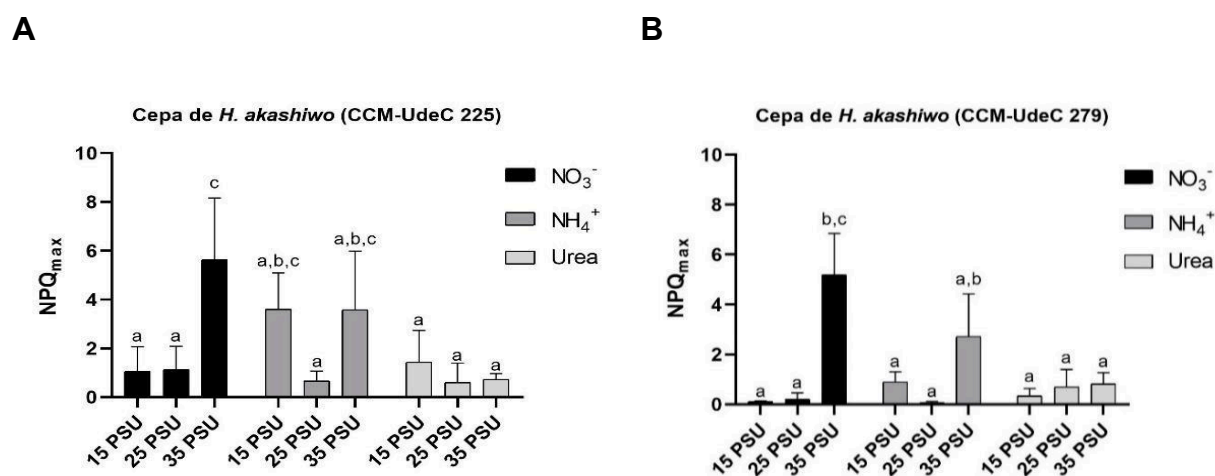


Figura 4. Extinción no fotoquímica máxima (NPQ_{max}) registrada en el día 10 para la cepa CCM-UdeC 225 (**A**) y la cepa CCM-UdeC 279 (**B**) en sus respectivos tratamientos.

5.4 Bioensayo de toxicidad con *Danio rerio*

Ensayo preliminar

En la etapa inicial de ajuste de las concentraciones del extracto de *H. akashiwo* (cepa CCM-UdeC 225) (**Tabla 1**), se detectaron anomalías del desarrollo en los organismos expuestos a concentraciones del extracto al 25%; 50%; 62,5%, 75 % y 87.5 %; mientras que a una concentración del 100%, se registró mortalidad completa de los embriones tratados.

Las anomalías observadas incluyeron edemas pericárdicos (por ejemplo, **Figura 6G e I; ***), acumulación sanguínea en saco vitelino (**Figura 6G; +**); malformaciones de la notocorda, como lordosis (**Figura 6K**) y escoliosis (**Figura 6J**); torsión caudal (**Figura 6D**) y cola bífida (**Figura 6D**), así como una deficiente absorción del vitelo (ejemplo **Figura 6D, F, I; -**). En los embriones expuestos a las condiciones control (medio E3 y extracto de *T. tetraathele*) no se observaron anomalías (**Figura 5A y B**).

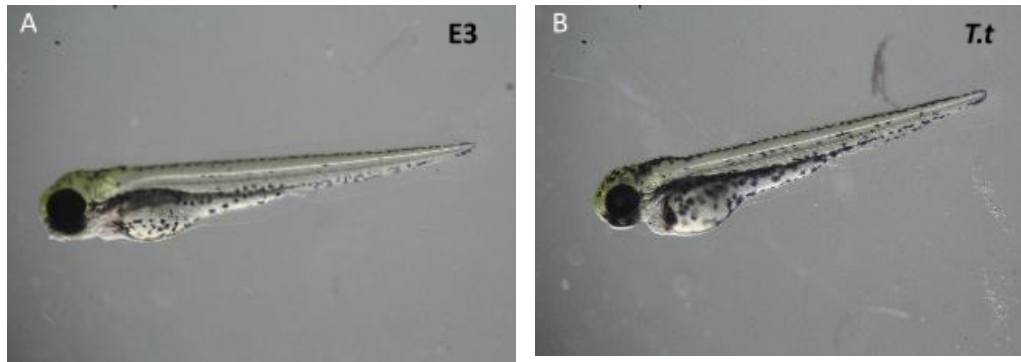
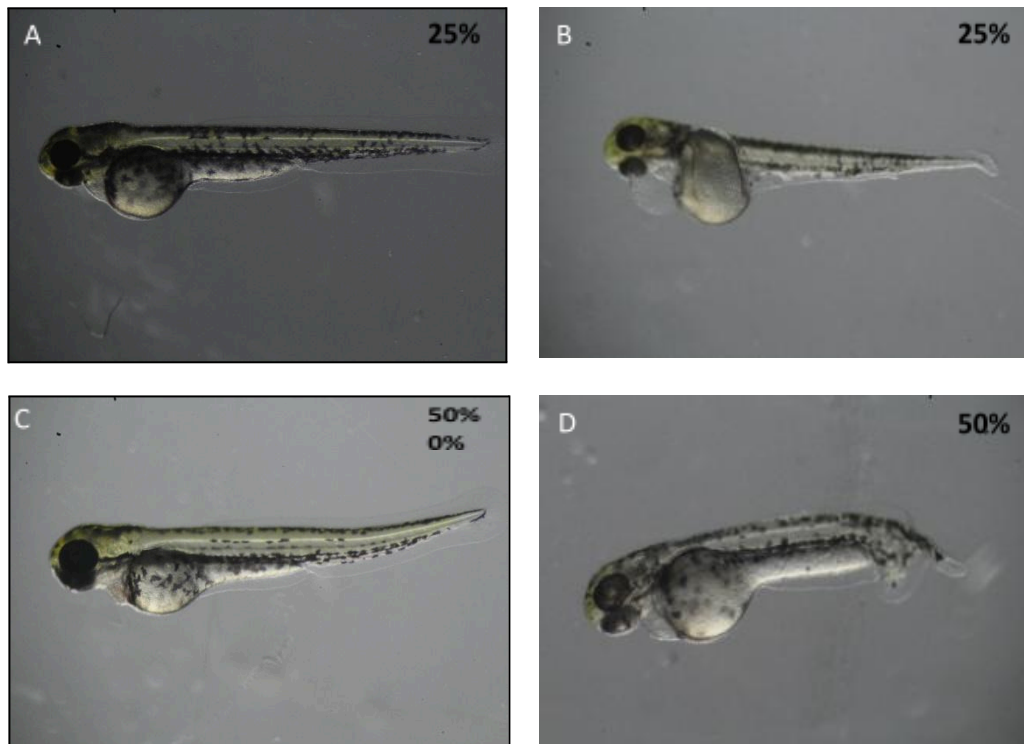


Figura 5. Bioensayo preliminar con embriones de *Danio rerio* expuestos a las condiciones control: **A)** medio de cultivo control (EM); **B)** Extracto de *T. tetraele* (100%); Imágenes correspondientes a las primeras 72 hrs de exposición.



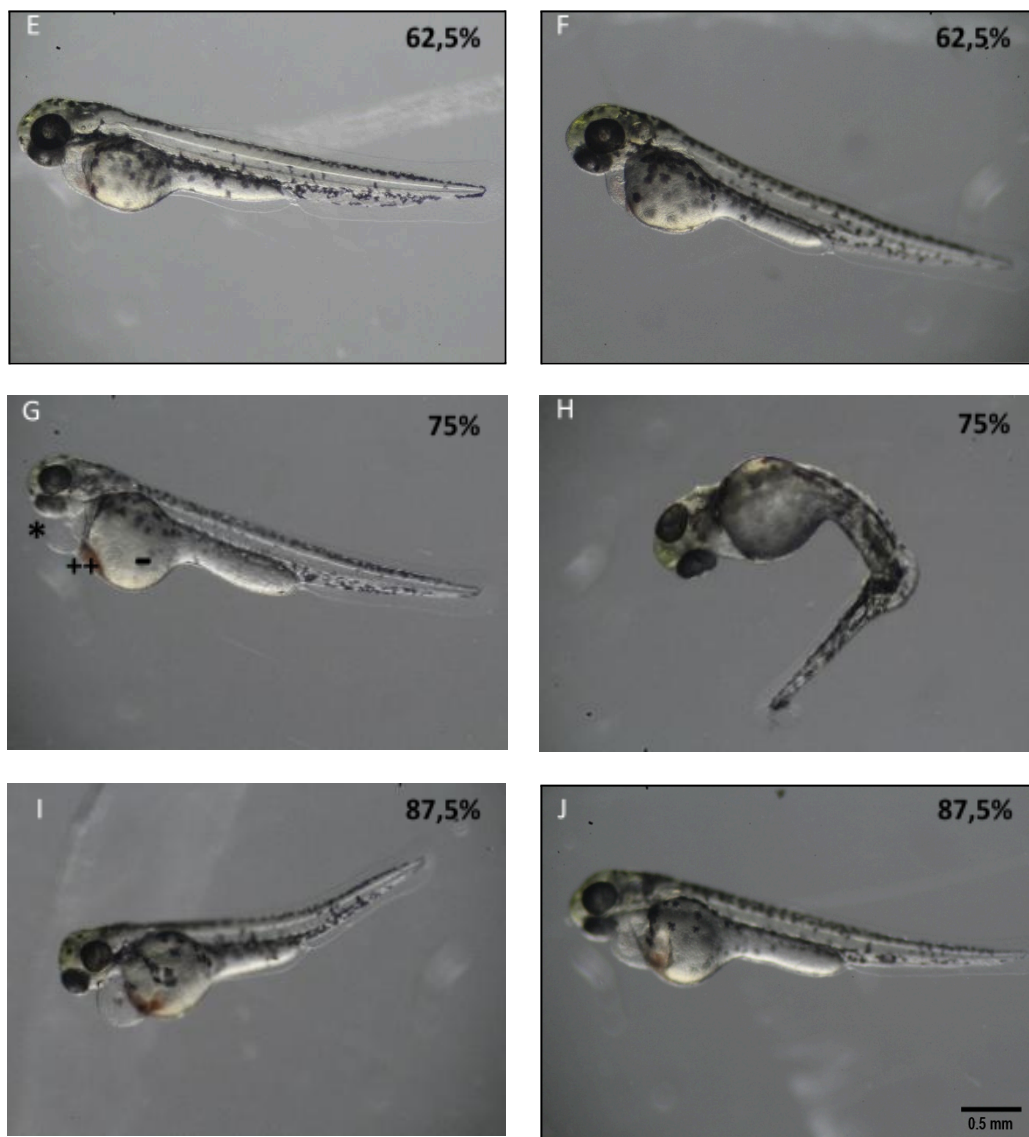


Figura 6. Bioensayo preliminar con embriones de *Danio rerio* expuestos al extracto de la cepa CCM-UdeC 225 (aumento 3.2 x) **A)** y **B)** extracto de *H. akashiwo* al 25%; **C)** y **D)** extracto de *H. akashiwo* a 50%; **E)** y **F)** extracto de *H. akashiwo* al 62,5 %; **G)** y **H)** extracto de *H. akashiwo* al 75%; **I)** y **J)** extracto de *H. akashiwo* al 87.5%. Imágenes correspondientes a las primeras 72 hrs de exposición.

En el siguiente experimento, que consideró concentraciones de entre 10 y 35% del extracto, se mostró un efecto dosis dependiente en la mortalidad de los huevos de *D. rerio* (**Figura 7**). A concentraciones iguales o inferiores al 20% del extracto, no se registró mortalidad (**Figura 7A**). Así también se evidenció que la tasa de eclosión de los embriones sobrevivientes disminuye progresivamente a medida que aumenta la concentración del extracto, aunque esta tendencia no fue estadísticamente significativa (**Figura 7B**).

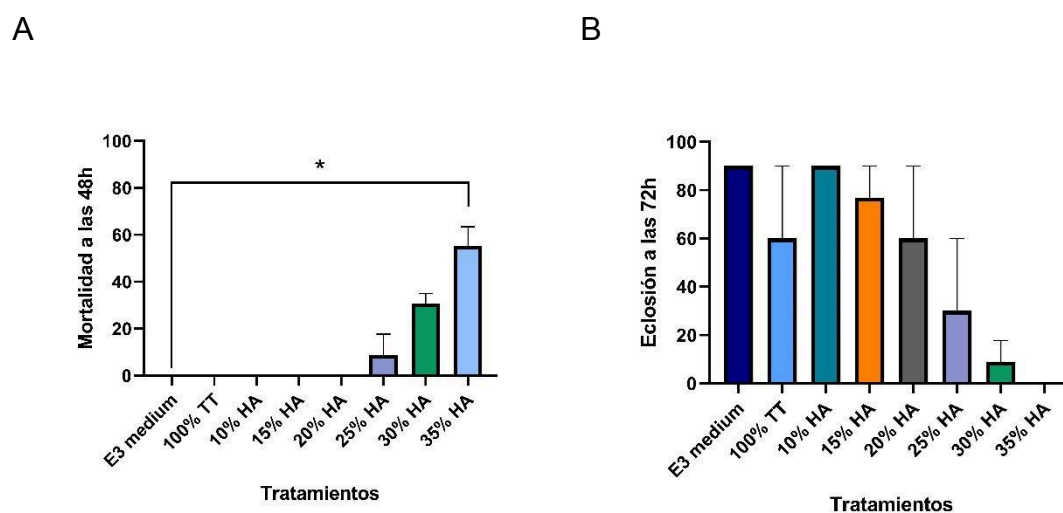


Figura 7. Bioensayo preliminar que evalúa diferentes concentraciones de *Heterosigma akashiwo* (cepa CCM-UdeC 225) en etapas tempranas del desarrollo de *Danio rerio*. Se muestran los porcentajes de mortalidad de huevos (**A**) y éxito de eclosión a las 72 horas post-exposición (**B**). Se utilizaron como controles el medio E3 y extracto de *Tetraselmis tetraathele* al 100 %. Las barras representan la media \pm error estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el medio control E3, determinadas mediante análisis de Kruskal-Wallis seguido de la prueba post hoc de Dunn ($p < 0,05$).

Las anomalías observadas en este segundo ensayo en los embriones de *Danio rerio* expuestos a los distintos tratamientos incluyeron la ausencia o el retraso en la pigmentación, así como la presencia de edemas pericárdicos y vitelinos. Estas alteraciones comenzaron a manifestarse a partir de concentraciones del 25% del extracto, y se mantuvieron con una frecuencia similar en concentraciones superiores.

En base a estos resultados (**Figura 7**) se seleccionó la concentración de extracto al 25% para la realización de los ensayos comparativos entre cepas y tratamientos durante la fase experimental.

Fase experimental

Se evaluó el porcentaje de mortalidad acumulada de huevos de *D. rerio* a las 48 horas de exposición a los extractos (25% v/v) de ambas cepas cultivadas en los distintos tratamientos de salinidad y fuente de nitrógeno (**Figura 8A y B**).

Se aplicó un análisis comparativo entre todos los tratamientos mediante un test post hoc de Dunn, de forma independiente para cada cepa y sus respectivos tratamientos. En la matriz de datos, se evaluaron todas las comparaciones posibles entre tratamientos; no obstante, en los gráficos (**Figura 8A y B**) se presentan únicamente aquellas comparaciones consideradas relevantes para

los objetivos del estudio, específicamente las realizadas entre una misma salinidad y las distintas fuentes de nitrógeno (NH_4^+ , NO_3^- , urea), así como con sus respectivas comparaciones con los tratamientos control (Medio E3 y *T. tetrahele*).

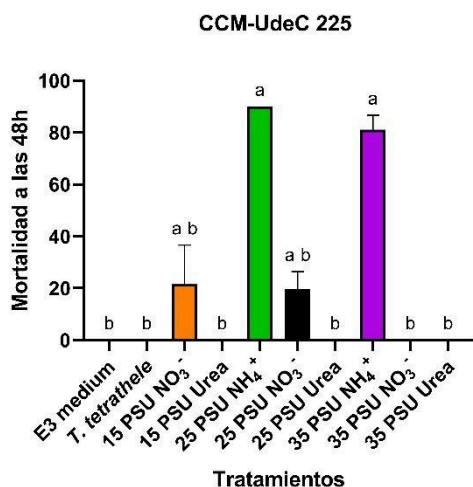
Para la cepa CCM-UdeC 225 se observaron diferencias significativas entre el control (medio E3) y los tratamientos 25 PSU/ NH_4^+ y 35 PSU/ NH_4^+ , siendo el NH_4^+ la única fuente de nitrógeno que evidenció un efecto letal en los embriones, con diferencias significativas respecto a los controles (medio E3 y *T. tetrahele*). Por el contrario, los extractos provenientes de tratamientos con NO_3^- y urea mostraron leves a ausentes efectos de toxicidad en todos los niveles de salinidad. Por último, el extracto de *T. tetrahele*, utilizado como segundo control negativo, no presentó diferencias con el medio E3 (control; **Figura 8A**).

Respecto al potencial tóxico de los extractos obtenidos a partir de la cepa CCM-UdeC 279, el análisis estadístico evidenció que los extractos obtenidos de todas las fuentes de nitrógeno evaluadas generaron efectos letales en los embriones de *D. rerio*, aunque con distinta intensidad entre los tratamientos. Los extractos más tóxicos corresponden a la fuente de nitrógeno NH_4^+ seguidos por los tratamientos con urea, y en menor medida por los tratamientos con NO_3^- , los cuales igualmente presentaron efectos significativos (**Figura 8B**). La única excepción fue el tratamiento 15 PSU/urea, que no produjo efectos letales sobre los embriones y no presentó diferencias significativas con los controles (medio

E3 y *T. tetrathele*). Asimismo, el extracto de *T. tetrathele*, utilizado como segundo control negativo, no mostró diferencias significativas respecto del medio E3.

La combinación 15 PSU/ NH_4^+ no fue incluida en ninguno de los gráficos debido a que la densidad celular obtenida del cultivo fue insuficiente para obtener el extracto.

A



B

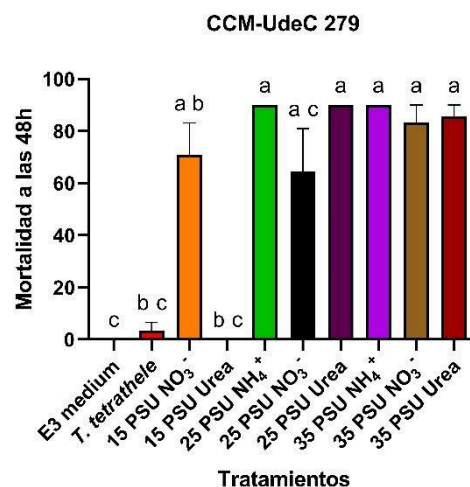


Figura 8. Mortalidad en embriones de *Danio rerio* 48 horas después de la exposición a extractos de *Heterosigma akashiwo* de las cepas CCM-UdeC 225 (A) y CCM-UdeC 279 (B), cultivados en diferentes condiciones de salinidad y fuente de nitrógeno. Se utilizó medio E3 y extracto 100 % de *Tetraselmis tetrathele* como controles. Las barras representan la media \pm error estándar. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, determinadas mediante el análisis de Kruskal-Wallis seguido de la prueba post hoc de Dunn ($p < 0,05$).

Se evaluó la eclosión de los embriones de *Danio rerio* expuestos a los distintos tratamientos con los extractos de la cepa CCM-UdeC 225. En general, se registró un porcentaje muy reducido de embriones eclosionados en los distintos tratamientos en comparación con ambos controles (medio E3 y *T. tetrathele*) (**Figura 9A**). El tratamiento con NH_4^+ a 25 PSU provocó la ausencia total de individuos vivos a las 48 horas por lo que no fueron considerados en la **Figura 9A**.

Respecto a la exposición de los embriones de *D. rerio* a los extractos obtenidos de la cepa CCM-UdeC 279, cultivada en los distintos tratamientos, no se registró eclosión en ninguno de los tratamientos con NO_3^- , ni en la condición 35 PSU en urea. No obstante, estas respuestas no mostraron diferencias significativas respecto de los controles. En ambos controles, en cambio, se observó un alto porcentaje de eclosión. Por otra parte, el extracto proveniente de cultivos con urea a 15 PSU fue la única condición en la que se registró un reducido número de individuos eclosionados (**Figura 9B**). Durante la exposición al extracto de la cepa CCM-UdeC 279 aplicado a los embriones de *D. rerio*, los tratamientos con NH_4^+ y con urea a 25 PSU provocaron la ausencia total de individuos vivos a las 48 horas, por lo que no fueron incluidos en la **Figura 9B**.

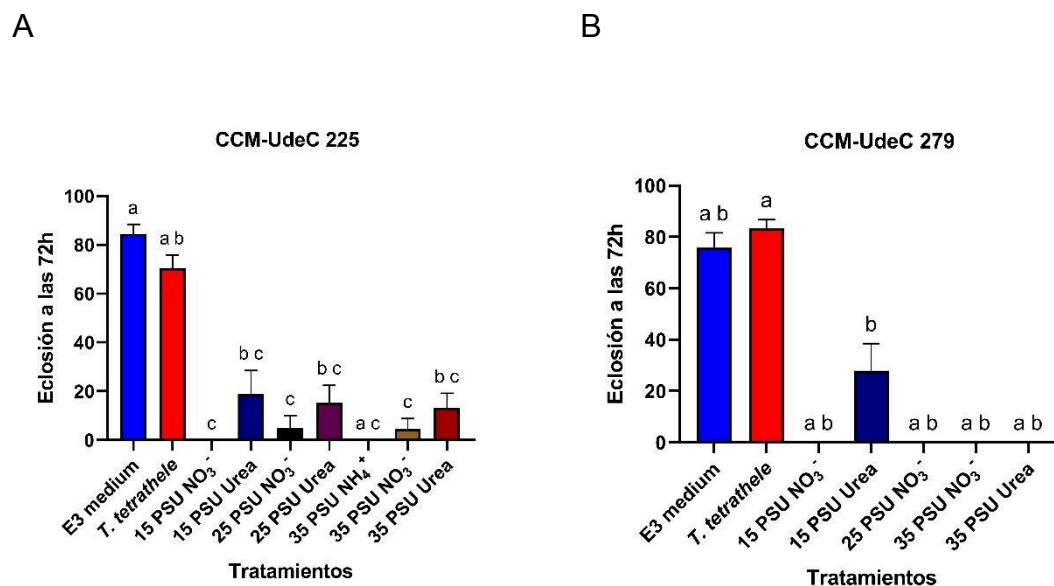


Figura 9. Éxito de eclosión en embriones de *Danio rerio* 72 horas después de la exposición a extractos de *Heterosigma akashiwo* de las cepas CCM-UdeC 225 (A) y CCM-UdeC 279 (B), cultivados en diferentes condiciones de salinidad y fuente de nitrógeno. Se utilizó medio E3 y extracto 100 % de *Tetraselmis tetraethele* como controles. Las barras representan la media \pm error estándar. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, determinadas mediante el análisis de Kruskal-Wallis seguido de la prueba post hoc de Dunn ($p < 0,05$).

Dado que el porcentaje de eclosión de los huevos expuestos a los extractos registró un número muy reducido de individuos, se procedió a registrar el total de anomalías o efectos subletales presentes, tanto en los embriones no eclosionados, como en las larvas que alcanzaron este estado. Entre los efectos subletales registrados estaban signos asociados al retraso en el desarrollo (pigmentación ausente o deficiente, absorción incompleta del vitelo, lordosis, escoliosis y desarrollo incompleto) y presencia de edemas (Figura 10).

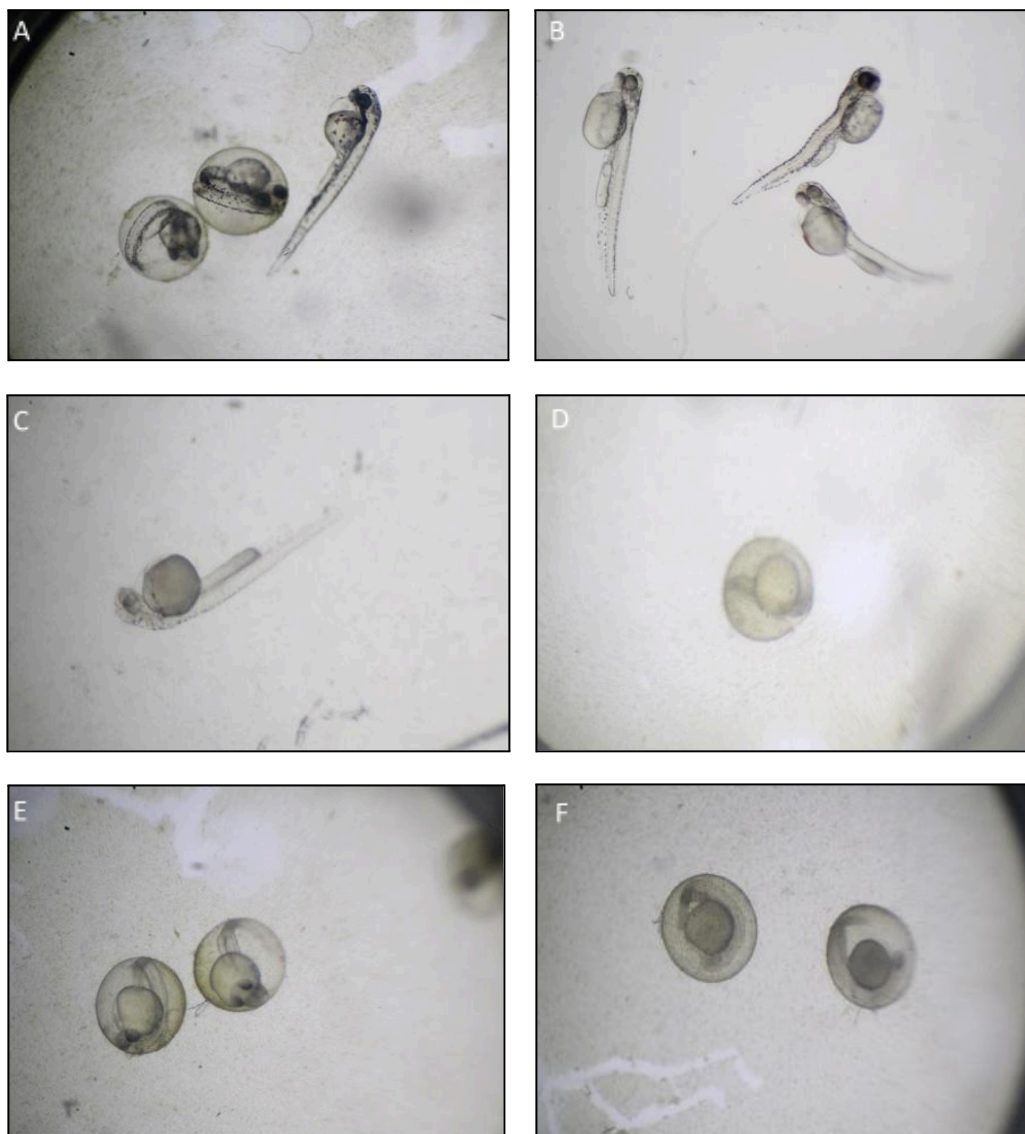


Figura 10. Anomalías observadas en los embriones de *D. rerio* expuestos a los extractos de las cepas de *H. akashiwo* (CCM-UdeC 225 y CCM-UdeC 279) a una concentración del 25%, obtenidos a partir de cultivos mantenidos en distintas condiciones de salinidad y fuente de nitrógeno (aumento 2.0x). Entre las anomalías se registró una pigmentación ausente o deficiente **C)** y **E)**, absorción incompleta del vitelo **A)**, **B)** y **C)**, hemorragia **B)**, lordosis **B)**, escoliosis **B)**, desarrollo embrionario incompleto **D)** y **F)**, edema pericárdico **A)** y **B)**, edema vitelino **C)** y **E)**.

Para la cepa CCM-UdeC 225, los controles con medio E3 y *T. tetrathele* mostraron mínimos efectos sobre el desarrollo embrionario y en los embriones hubo ausencia de edemas. En contraste, los tratamientos con NH_4^+ a 35 PSU provocaron un retraso significativo. El efecto con NO_3^- fue dependiente de la salinidad, observándose un alto retraso en el desarrollo a 15 y 25 PSU, mientras que a 35 PSU la toxicidad disminuyó. En los tratamientos con urea, el mayor efecto en el retraso en el desarrollo de los embriones se observó a 25 PSU, disminuyendo a 15 y 35 PSU (**Tabla 4, en ANEXO**).

Para la cepa CCM-UdeC 279, los controles no presentaron efectos subletales. Sin embargo, los tratamientos con NO_3^- fueron altamente tóxicos en todas las salinidades, evidenciando un total retraso en el desarrollo y una elevada presencia de edemas. La urea a 35 PSU mostró efectos similares, mientras que el tratamiento con urea a 15 PSU, presentó un elevado retraso en el desarrollo con más de la mitad de los individuos con edemas. No se evaluaron condiciones con NH_4^+ y urea a 25 PSU debido a mortalidad total (**Tabla 4, en ANEXO**).

La cepa CCM-UdeC 279 presentó una toxicidad más pronunciada en comparación con la cepa CCM-UdeC 225. La interacción entre la fuente de nitrógeno y la salinidad fue determinante en la toxicidad y efectos subletales, destacando la mayor sensibilidad a salinidades intermedias (25 PSU) en el

retraso en desarrollo, y la presencia de edemas en CCM-UdeC 279 (**Tabla 4**, en **ANEXO**).

6. DISCUSIÓN

El sistema costero de la Patagonia norte y central de Chile se ha establecido como un área estratégica para la producción de salmón, un recurso altamente demandado en los mercados internacionales. Debido a sus condiciones ambientales favorables, Chile se ha posicionado como el segundo mayor productor mundial de salmónidos de cultivo (Avendaño-Herrera *et al.*, 2018); sin embargo, este sistema también se caracteriza por su complejidad, dinamismo y gran extensión. Su morfología incluye fiordos, canales, golfos, estuarios y bahías, lo que la convierte en un territorio particularmente vulnerable debido a su alta sensibilidad a perturbaciones ambientales y actividades humanas (Pantoja *et al.*, 2011; Iriarte *et al.*, 2023).

La estructura oceanográfica de esta zona surge de la interacción entre aguas oceánicas profundas, de alta salinidad y elevado contenido de nutrientes, y aguas superficiales dulces, de menor salinidad, y bajo contenido de nutrientes (Iriarte *et al.*, 2010). El encuentro de estas masas de agua con propiedades distintas genera una dinámica marcada por fuertes diferencias fisicoquímicas, lo

que se refleja en pronunciadas variaciones horizontales y verticales de salinidad, densidad, disponibilidad lumínica y proporciones de nutrientes orgánicos e inorgánicos (Iriarte *et al.*, 2014).

La ocurrencia de floraciones algales en este tipo de ecosistemas marinos se ha vuelto cada vez más frecuente e intensa. Estos fenómenos alteran la composición y estructura de las comunidades biológicas, modificando las interacciones tróficas, las cuales se asocian con pérdidas económicas de importancia regional y global (Anderson *et al.*, 2002). Comprender los factores que determinan la ocurrencia y toxicidad de las floraciones algales se ha convertido en una necesidad prioritaria, dado su impacto ecológico y económico (Barría *et al.*, 2022; Díaz *et al.*, 2019). En este contexto, *Heterosigma akashiwo* ha recibido particular atención debido a su capacidad de formar floraciones densas, que en muchos casos son tóxicas y provocan mortalidades masivas de peces (Honjo, 1992; Mardones *et al.*, 2023). Esta especie se caracteriza por poseer estrategias competitivas, como la migración vertical, que le permite acceder a gradientes de luz y nutrientes espacialmente separados en columnas de agua estratificadas (Smayda, 1998; Clark & Flynn, 2002). Asimismo, se ha documentado que tanto factores ambientales como la variabilidad intraespecífica de las cepas influyen en la toxicidad de *H. akashiwo* (Twiner *et al.*, 2004; Fredrick *et al.*, 2011; Cochlan *et al.*, 2012; Gómez *et al.*, 2022).

Si bien no todas las FANs pueden atribuirse directamente a procesos de eutrofización, varios estudios han señalado una estrecha relación entre su ocurrencia y las actividades humanas que incrementan la carga de nutrientes en estos ecosistemas marinos (Anderson *et al.*, 2002; Glibert *et al.*, 2006). En este contexto, los fiordos se destacan como sistemas particularmente vulnerables, al tratarse de regiones relativamente prístinas que son sensibles tanto a factores de estrés climático como antropogénicos (Mardones *et al.*, 2023). Para el caso de *H. akashiwo*, existen pocos estudios que evalúen el efecto del nitrógeno, y sus formas químicas sobre la dinámica de crecimiento (Chang & Page, 1995; Herndon & Cochlan, 2007; Matheson *et al.*, 2014; Kok *et al.*, 2015; Ji *et al.*, 2020) y, no hay registro respecto a la influencia de estas fuentes de nitrógeno sobre su toxicidad. Esta limitación es aún más relevante si se considera la interacción del nitrógeno con otros factores ambientales, como la salinidad, temperatura, e irradiancia, los cuales han sido identificados como factores determinantes en el crecimiento de esta especie (Martínez *et al.*, 2010); y que además, modulan las respuestas fisiológicas y potencial tóxico (Ono *et al.*, 2000; Sandoval-Sanhueza *et al.*, 2022).

6.1 Efecto de la salinidad y fuente de nitrógeno en el crecimiento de *H.*

akashiwo

El primer objetivo de este estudio fue evaluar cómo la salinidad y la fuente de nitrógeno influyen en el crecimiento de dos cepas de *H. akashiwo* de distinto origen geográfico. Los resultados muestran que ambos factores, tanto de forma

independiente como en interacción, influyen significativamente en la dinámica de crecimiento (**Figura 17.A y Figura 18.A**); todas las combinaciones permitieron la división celular, aunque se observaron diferencias en la respuesta específica de cada cepa (**Tabla 2**)

En el caso de la cepa CCM-UdeC 225, las mayores tasas de crecimiento se registraron a salinidades iguales o superiores a 25 PSU, aun cuando el ambiente natural desde el cual fue aislada la cepa presentaba una salinidad considerablemente menor (16,7 PSU; Gómez *et al.*, 2022). Este resultado evidencia una alta plasticidad que ha sido observada previamente, en cepas de *H. akashiwo* las cuales respaldan la idea de que es una especie eurihalina, capaz de tolerar un amplio rango de salinidades, que va desde los 5 hasta 40 PSU (Haque & Onoue, 2002; Kempton *et al.*, 2008). Así mismo sugiere que la salinidad óptima de crecimiento no refleja las condiciones ambientales del sitio de aislamiento, sino a procesos de aclimatación y a la amplia tolerancia intrínseca de la especie.

Si bien los máximos de crecimiento se distribuyen en distintos niveles de salinidad según la combinación de tratamientos, se observó que la cepa CCM-UdeC 279 tiende a concentrar sus mayores tasas de crecimiento en salinidades bajas a intermedias (≤ 25 PSU), particularmente en presencia de urea como fuente de nitrógeno. En contraste, la cepa chilena (CCM UdeC 225) exhibió una respuesta más amplia frente al gradiente de salinidad, con mayores

tasas de crecimiento asociadas a salinidades intermedias a altas. Esto se contradice con la tendencia observada en estudios previos donde se ha identificado que una salinidad cercana a 25 PSU constituye un rango óptimo para la germinación y el crecimiento de *Heterosigma akashiwo* en cepas aisladas en Japón (Haque & Onoue, 2002), Estados Unidos (Kempton *et al.*, 2008; Imai *et al.*, 2016) y Chile (Sandoval-Sanhueza *et al.*, 2022). No obstante, estos estudios evaluaron el crecimiento en condiciones de cultivo en las que el NO_3^- fue la principal fuente de nitrógeno, lo que limita la comparación con los resultados obtenidos en este trabajo. En este estudio, considerando condiciones comparables con NO_3^- , ambas cepas evaluadas presentaron un patrón distinto, registrando sus mayores tasas de crecimiento a 35 PSU. Estos resultados concuerdan con lo observado por Flores-Leñero (2022), quienes también reportaron que la cepa chilena CREAN_HA03 presentó mayores tasas de crecimiento a salinidades de 35 PSU en comparación a salinidades menores. Asimismo, al comparar todos los niveles de salinidad evaluados (15, 25 y 35 PSU) en esta misma fuente de nitrógeno, se observó que ambas cepas (CCM UdeC 225 y CCM UdeC 279) mantuvieron tasas de crecimiento superiores a las reportadas en los estudios previamente mencionados.

Ji *et al.* (2020) documentaron que el NH_4^+ es la forma de nitrógeno de asimilación más directa para *H. akashiwo*, siendo considerado un nutriente adecuado para esta especie. Además, varios estudios han reportado tasas de crecimiento iguales o superiores en presencia de amonio, respecto a otras

fuentes nitrogenadas (Clark & Flynn ,2002; Herndon & Cochlan, 2007; Kok *et al.*, 2015). No obstante, en el presente estudio, si bien una de las mayores tasas de crecimiento se registró en tratamientos con NH_4^+ , las densidades celulares alcanzadas fueron relativamente bajas, además, las células cultivadas con NH_4^+ presentaron alteraciones morfológicas, tales como deformación y aumento de tamaño celular (**Figura 12**). Estos efectos concuerdan con lo reportado por Chang & Page, (1995), quienes, en condiciones comparables, observaron signos de toxicidad como alteraciones morfológicas e inhibición del crecimiento, en presencia de formas reducidas de nitrógeno, particularmente en NH_4^+ .

Tanto la cepa CCM UdeC 225 como la CCM UdeC 279 incluidas en este estudio presentaron sus mayores tasas de crecimiento cuando se cultivó con urea (**Tabla 3**), lo cual resulta interesante, ya que este resultado se contrapone con la mayoría de los antecedentes previos (Chang & Page, 1995; Kok *et al.*, 2015; Matheson *et al.*, 2014; Ji *et al.*, 2020), donde la urea no fue identificada como la fuente de nitrógeno preferida para esta especie. Esta discrepancia puede deberse a la alta plasticidad fenotípica entre las cepas, como también a las condiciones de cultivo empleadas. Por ejemplo, Matheson *et al.* (2014) observaron una mayor tasa de crecimiento con NO_3^- en comparación con NH_4^+ y urea a irradiancias entre 65-80 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mientras que Herndon & Cochlan (2007), reportaron un crecimiento menor con NO_3^- respecto a urea y NH_4^+ cuando las células fueron cultivadas a una irradiancia de 40 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, lo que sugiere que la respuesta de *H. akashiwo* a las distintas

fuentes de nitrógeno puede estar altamente condicionada por los otros factores abióticos (e.g. luz) presentes en ese momento.

La cepa chilena CCM-UdeC 225, ha sido utilizada previamente en dos estudios (Sandoval-Sanhueza *et al.*, 2022; Gómez *et al.*, 2022). En dichos trabajos, la cepa fue cultivada a 15°C, con una irradiancia de 50 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, utilizando NO_3^- como fuente de nitrógeno, y a salinidades de 15 y 20 PSU. La tasa máxima de crecimiento reportada por Sandoval-Sanhueza *et al.* (2022) alcanzó 0.99 div. d^{-1} , valores similares a los registrados en el presente estudio en condiciones similares (1.01 div. día^{-1}), sin observarse diferencias significativas entre las salinidades 15 y 25 PSU (**Tabla 3**). No obstante, Gómez *et al.* (2022) reportaron una tasa de crecimiento considerablemente mayor (1.66 div. día^{-1}), junto con una densidad celular aproximada de 1.000.000 células mL^{-1} al día 10 de cultivo. En contraste, en condiciones comparables, este estudio al día 10 alcanzó una densidad celular de 183.280 células mL^{-1} (**Tabla 2**), valor inferior que el reportado por Gómez *et al.* (2022) como por Sandoval-Sanhueza *et al.* (2022) al día 15 de cultivo (309.000 células mL^{-1}). Estas diferencias podrían atribuirse, en parte, a la temperatura utilizada en este trabajo ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), el cual se ha señalado como uno de los factores incidente en el crecimiento de esta especie (Ono *et al.*, 2000); así como a posibles cambios fisiológicos derivados del tiempo de mantención de la cepa en condiciones de laboratorio (Lakeman *et al.*, 2009).

Adicionalmente, estudios con la cepa chilena CREAN_HA03 han reportado tasas de crecimiento y densidades celulares notablemente menores en una irradiancia de $100 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En particular, Flores-Leñero *et al.*, (2022) observaron, a 25 PSU y 17°C , tasas de crecimiento y densidad celulares reducidas ($0,38 \text{ div día}^{-1}$ y aproximadamente $20.000 \text{ células mL}^{-1}$, respectivamente) las cuales aumentaron a una salinidad de 30 PSU y a una temperatura de 12°C , alcanzando valores de $0,48 \text{ div. día}^{-1}$ y cerca de $50.000 \text{ células mL}^{-1}$. De manera similar, Mardones *et al.* (2023) señalaron que, a 15°C , y en un rango de salinidad entre 15 a 32 PSU, las tasas de crecimiento variaron levemente ($0.23 - 0.11 \text{ div. día}^{-1}$), mientras que las densidades celulares máximas se registraron en salinidades intermedias (21 y 27 PSU), con valores de 7.344 y $7.813 \text{ células mL}^{-1}$ respectivamente.

6.2 Efecto de la salinidad y fuente de nitrógeno sobre el contenido de pigmentos y parámetros fotosintéticos en *H. akashiwo*

Las células fitoplanctónicas presentan una notable plasticidad en la regulación de su contenido y proporción de pigmentos fotosintéticos en respuesta a las variaciones en las condiciones lumínicas y de disponibilidad de nutrientes (Rodríguez *et al.*, 2006). En particular, *H. akashiwo*, presenta un perfil de pigmentos característico compuesto por clorofila a, clorofilas c_1 y c_2 , β -caroteno, así como los carotenoides fucoxantina y violaxantina (Martínez *et al.*, 2010). La

composición de pigmentos desempeña un rol importante en la aclimatación fisiológica de *H. akashiwo*, dado que, mediante la migración vertical diaria, pueden generarse variaciones en las proporciones de pigmentos, lo que le permite a la especie ajustarse a los gradientes de luz en la columna de agua, favoreciendo tanto la eficiencia en la captura lumínica como la activación de mecanismos de fotoprotección bajo condiciones de fluctuación lumínica (Flores-Leñero *et al.*, 2022).

El pigmento más abundante para ambas cepas de *H. akashiwo* evaluadas en este estudio fue la clorofila a, seguido de carotenoides totales y clorofila c_1 y c_2 (**Tabla 4**). Este patrón es congruente con el descrito por Flores-Leñero *et al.*, (2022) quienes a baja irradiancia ($LL = 50 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$), reportaron que la clorofila a constituía el 62 % del total de pigmentos, con un valor de $8,9 \text{ pg célula}^{-1}$, mientras que las clorofilas c_2 y c_1 se ubicaron dentro de los pigmentos minoritarios por debajo de la fucoxantina ($3,38 \text{ pg célula}^{-1}$) y la violaxantina ($0,96 \text{ pg célula}^{-1}$), proporciones que no mostraron variaciones a alta irradiancia ($HL = 150 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$). De manera similar, Butrón *et al.* (2012) observaron que a irradiancias superiores a $100 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la clorofila a continuó siendo el pigmento dominante, seguida por fucoxantina y violaxantina, lo que confirma la prevalencia de este patrón pigmentario incluso en condiciones de mayor irradiancia.

En este estudio, las dos cepas evaluadas evidenciaron una marcada plasticidad en su composición de pigmentos a nivel celular. Si bien la clorofila a se mantuvo como el pigmento principal en todos los tratamientos, la cepa CCM-UdeC 225 presentó, concentraciones menores en comparación con la cepa CCM-UdeC 279, con excepción del tratamiento con NH_4^+ a 15 PSU, donde no se detectaron diferencias significativas entre ambas cepas (**Tabla 4**). Esta tendencia coincide con lo reportado por Gómez *et al.* (2022); sin embargo, los valores difieren ampliamente entre estudios. En condiciones experimentales comparables (NO_3^- a 15 PSU), la cepa CCM-UdeC 225 alcanzó un contenido de clorofila a cuatro veces mayor al reportado (5 vs 1,2 pg cell⁻¹), mientras que, para la cepa CCM-UdeC 279 el valor registrado en este estudio fue inferior (11 vs 14 pg cell⁻¹).

La acumulación de carotenoides totales también fue superior en la cepa CCM-UdeC 279 en comparación con la cepa CCM-UdeC 225 (**Tabla 4**). Estas observaciones son coherentes con lo reportado por Gómez *et al.* (2022), quienes encontraron que la cepa CCM UdeC 279 alcanzó niveles de carotenoides significativamente más altos (4,5 pg cell⁻¹) que la cepa CCM UdeC 225 (0,4 pg cell⁻¹). Sin embargo, los valores obtenidos en el presente estudio fueron sustancialmente mayores a lo reportado por Gómez *et al.* (2022), para ambas cepas: 7 pg cell⁻¹ en CCM-UdeC 279 y 3 pg cell⁻¹ en CCM-UdeC 225 en condiciones comparables (NO_3^- a 15 PSU).

Cabe destacar que las clorofilas c_1 y c_2 presentaron las concentraciones más bajas, e incluso se encontraron ausentes en algunas condiciones experimentales (**Tabla 4**). Esta tendencia coincide con lo reportado por Flores-Leñero *et al.*, (2022), quienes también describieron un contenido reducido de estos pigmentos en *H. akashiwo*. No obstante, nuestros resultados contrastan marcadamente con los de Butrón *et al.* (2012), quienes registraron concentraciones considerablemente más elevadas de clorofilas c_1 y c_2 . La baja concentración de estos pigmentos, en este estudio, podría estar relacionada con las diferencias en las condiciones de cultivo o con el estado fisiológico de las cepas.

Asimismo, la proporción carotenoides:clorofila a fue similar entre ambas cepas para todos los tratamientos evaluados (**Tabla 4**). Esta tendencia coincide parcialmente con lo reportado por Gómez *et al.* (2022) quienes también observaron proporciones similares entre sus cepas bajo una única condición experimental evaluada (NO_3^- a 15 PSU). No obstante, los valores obtenidos en dicho estudio fueron considerablemente menores que los registrados en el presente trabajo. De manera concordante, en condiciones comparables (NO_3^- a 20 PSU) Martínez *et al.* (2010) describen un perfil de pigmentos altamente conservado, con proporciones relativamente constantes de fucoxantina (0,76) y violaxantina (0,21) respecto a la clorofila a, y no observaron diferencias significativas entre las 6 cepas evaluadas, las cuales fueron cultivadas en condiciones exentas de estrés lumínico y de limitación nutricional.

La acumulación de pigmentos como clorofila a, clorofilas c_1 y c_2 , y carotenoides por célula fue mayor en la condición de NH_4^+ a 15 PSU. Esta condición mantuvo tasas de crecimiento similares en ambas cepas (1,2 y 1,3 div. día⁻¹); sin embargo, se asoció a una baja densidad celular y la presencia de alteraciones morfológicas. Estos resultados sugieren una posible priorización de recursos hacia la captación y regulación de la energía fotosintética, por sobre la división celular. De manera concordante, se ha descrito en cultivos de microalgas un fenómeno similar, que consta de una inversión metabólica entre los mecanismos de defensa y los de proliferación celular (Wagner *et al.*, 2006).

En este estudio se evaluaron algunos parámetros fotosintéticos de las cepas de *H. akashiwo*, cultivadas en las distintas condiciones de salinidad y fuente de nitrógeno. Los mayores valores de eficiencia fotoquímica del fotosistema II (Fv/Fm) se observaron a 15 PSU para ambas cepas (**Figura 3**), alcanzando valores cercanos o superiores al óptimo esperado para cultivos en condiciones no estresantes (0,65; Parkhill *et al.*, 2001); mientras que los menores valores se registraron a salinidades de 25 y 35 PSU (**Figura 3**). Esta tendencia se observó de manera consistente en todas las fuentes de nitrógeno evaluadas y, coincide con los experimentos preliminares de Gómez *et al.* (2022), quienes también reportaron ausencia de estrés fisiológico en cultivos a 15 PSU. Debido a que los experimentos se realizaron a una baja irradiancia ($50 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$), las reducciones de Fv/Fm a salinidades más altas no se pueden atribuir a estrés lumínico, como describieron Hennige *et al.* (2013), quienes observaron una

disminución en F_v/F_m , al exponer a *H. akashiwo* a un cambio de luz abrupto de baja ($80 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a alta irradiancia ($400 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$); sino que podrían reflejar un efecto fisiológico asociado al aumento de la salinidad.

Los organismos fotosintéticos enfrentan diversos estresores abióticos, como la alta irradiancia, fluctuaciones de salinidad o variaciones térmicas, que pueden inducir el daño fotooxidativo al PSII, y alterar la biosíntesis de pigmentos fotosintéticos, afectando la eficiencia de los mecanismos de protección (Muller *et al.*, 2001; Nishiyama *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2008). En este estudio, los valores de la extinción no fotoquímica máxima, observados en ambas cepas de *H. akashiwo* fueron de manera general, bajos o moderados, lo que sugiere que las células cultivadas mantuvieron un estado fisiológico estable, y una limitada activación de mecanismos de disipación de energía en forma de calor (**Figura 4**). Este comportamiento probablemente se relaciona con las condiciones de irradiancia moderada en las que se desarrollaron los cultivos. Considerando que la función principal de la disipación no fotoquímica (NPQ) es eliminar el exceso de energía absorbida en el PSII para prevenir la fotoinhibición (Ruban, 2015), una baja presión fotooxidativa podría explicar que no se activaran los mecanismos de disipación de energía. No obstante, los valores más elevados de NPQ_{max} (2,72– 5,63) se observaron mayoritariamente en los tratamientos a 35 PSU, lo que indica que las cepas cultivadas a salinidades altas requieren una mayor activación de la disipación no fotoquímica para mitigar el estrés salino (**Figura 4a y 3b**).

De acuerdo con lo reportado por Hennige *et al.* (2013), la relación entre NPQ_{max} y los carotenoides, en particular los del grupo de las xantofilas, no desempeñan un papel principal en la disipación del exceso de energía en *H. akashiwo*, sugiriendo que estos pigmentos no constituyen el mecanismo de fotoprotección dominante en esta especie. En concordancia, los valores de NPQ_{max} en este trabajo indicaron bajos niveles de estrés en la mayoría de los cultivos (**Figura 4**) y no se evidenció una correlación directa entre el contenido de carotenoides y NPQ_{max} . Incluso en condiciones de mayor contenido de carotenoides este no se tradujo en una mayor capacidad de disipación no fotoquímica.

6.3 Toxicidad de los extractos de *H. akashiwo* cultivada en distintas salinidades y fuentes de nitrógeno.

Las cepas de *H. akashiwo* aisladas durante floraciones naturales pueden presentar amplias diferencias en la intensidad y el tipo de toxicidad que manifiestan. Estas variaciones se atribuyen a diferencias en su composición química, en las concentraciones de los metabolitos producidos y en la expresión de mecanismos dañinos que afectan a los organismos expuestos (Chang *et al.*, 1990; Haque & Onoue, 2002; Gómez *et al.*, 2022). En consecuencia, *H. akashiwo* es una especie capaz de generar tanto floraciones inocuas como eventos altamente perjudiciales para peces (Tango *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 1990; Mardones *et al.*, 2023), así como efectos adversos demostrados en

condiciones de laboratorio en invertebrados (Hegaret *et al.*, 2007; Gómez *et al.*, 2022).

La comparación entre ambas cepas en este estudio evidencia diferencias claras en su capacidad tóxica. La cepa CCM-UdeC 225 mostró un efecto letal considerablemente menor que la cepa CCM-UdeC 279. Esta última provocó mortalidad prácticamente en todas las combinaciones de salinidad y fuentes de nitrógeno evaluadas, a excepción del tratamiento urea a 15 PSU (**Figura 8** y **Figura 9**). Esta mayor toxicidad concuerda con lo descrito por Gómez *et al.* (2022), quienes reportaron una inhibición más pronunciada en la movilidad de las larvas de *A. salina* expuestas a células enteras de la cepa CCM-UdeC 279. En ese estudio, un 50 % de afectación se alcanzó con 1.136 células mL⁻¹, mientras que la cepa CCM-UdeC 225 requirió casi el doble de densidad celular para producir un efecto similar. Sin embargo, dichos resultados se obtuvieron bajo una única condición experimental (NO₃⁻ a 15 PSU), en la cual nuestro trabajo no registró una mortalidad asociada a la cepa CCM-UdeC 225.

Además de la mortalidad registrada, los embriones de *D. rerio* expuestos a los extractos de ambas cepas mostraron bajas tasas de eclosión a las 72 horas post-exposición (**Figura 9**) y desarrollaron anomalías morfológicas, entre ellas retraso en el desarrollo y edemas (**Figura 10**). Estos efectos subletales (anomalías) fueron menos frecuentes en los tratamientos con salinidad de 35 PSU para la cepa CCM-UdeC 225, sin embargo, la cepa CCM-UdeC 279,

indujo retraso en el desarrollo en todas las condiciones evaluadas, lo que refleja una alta capacidad tóxica independiente de las variaciones ambientales.

La salinidad se reconoce como uno de los principales factores ambientales que modulan la toxicidad de *H. akashiwo*. Sin embargo, la evidencia muestra resultados inconsistentes respecto a su efecto. Algunos estudios indican que a salinidades relativamente altas (30-32 PSU) puede incrementar la toxicidad de esta especie (Ikeda *et al.*, 2016; Sandoval-Sanhueza *et al.*, 2022), mientras que otros estudios reportan que valores más bajos (23-27 PSU) potencian los efectos tóxicos (Haque & Onoue, 2002; Flores-Leñero *et al.*, 2022). Estas discrepancias pueden explicarse por diferencias metodológicas entre los estudios, incluyendo el tipo de modelo biológico utilizado (líneas celulares de salmón o truchas y peces en diferentes etapas de desarrollo), así como la forma en la que se emplearon las células de las cepas en los bioensayos (células completas, lisados celulares o contenido extracelular).

Por ejemplo, Sandoval-Sanhueza *et al.* (2022) reportaron que lisados de la cepa CCM-UdeC 225 cultivada a 20 y 30 PSU, redujeron drásticamente la viabilidad de células de salmón Chinook pertenecientes a la línea CHSE-214, observándose un efecto ligeramente mayor cuando las microalgas fueron cultivadas a 30 PSU. En contraste, en el presente estudio la mortalidad de embriones de *D. rerio* provocada por la misma cepa no mostró una relación clara con la salinidad del cultivo. Sin embargo, evidenció un claro efecto

asociado a la fuente de nitrógeno NH_4^+ . Asimismo, en el trabajo de Sandoval-Sanhueza *et al.* (2022), no se observó un efecto dependiente de la dosis en un rango de concentración celulares entre 20 y 200.000 células mL^{-1} , tanto para los sobrenadantes como para los lisados celulares. En contraste, nuestro estudio el bioensayo preliminar (**Figura 7**) evidenció un patrón dosis-dependiente, observable a partir de extractos equivalentes a 1.250.000 células mL^{-1} (25%). Resultados comparables fueron reportados por Flores-Leñero *et al.* (2022), con la cepa chilena CREAN_HA03, donde se observó que el incremento de la concentración celular produjo progresivamente una disminución de la viabilidad en la línea celular epitelial de branquias de trucha arcoíris (RTgill-W1), alcanzando valores cercanos al 61%.

Las diferencias observadas entre los resultados de nuestro estudio y los reportados por Sandoval-Sanhueza *et al.* (2022) podrían explicarse, en parte, por las condiciones de cultivo utilizadas, y por el estado fisiológico de las células al momento de realizar los bioensayos. En el estudio de Sandoval-Sanhueza *et al.* (2022), las microalgas fueron utilizadas durante la fase exponencial de crecimiento, proveniente de cultivos semicontinuos enriquecidos cada 6 días con medio L1. Bajo estas condiciones, es probable que las células se encontraran metabólicamente activas, y en continua división celular. Mientras, que en el presente estudio se utilizaron cultivo tipo Batch, empleando células en fase exponencial tardía, etapa en la cual el crecimiento se ralentiza y el metabolismo presenta una actividad moderada. Se ha demostrado que la fase

de crecimiento de las microalgas tóxicas influye significativamente en su fisiología y en sus procesos metabólicos, lo que puede afectar su capacidad para sintetizar y acumular compuestos tóxicos (Anderson *et al.*, 1990; Bravo *et al.*, 2001; Kamiyama *et al.*, 2010; Tong *et al.*, 2011).

Las diferencias en las concentraciones necesarias para observar efectos tóxicos también podrían deberse al tipo de material algal utilizado en los bioensayos. Haque & Onoue (2002) observaron signos ictiotóxicos severos en juveniles del pez marino *Pagrus major* expuestos a células completas de *H. akashiwo* a densidades superiores a 24.100 células mL⁻¹, valores considerablemente menores que los utilizados en este estudio con lisados celulares. Una posible explicación es que en peces juveniles las branquias están directamente expuestas a las microalgas presentes en el medio, mientras que en embriones de *D. rerio* la envoltura coriónica actúa como una barrera que limita la exposición directa del embrión a los compuestos tóxicos (Lee *et al.*, 2007). Adicionalmente, se ha reportado que los peces marinos pueden ser más sensibles que los de agua dulce a ciertos contaminantes químicos (Hutchinson *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2021).

Es importante destacar que todos los estudios citados incluidos los de Haque & Onoue, (2002), Sandoval-Sanhueza *et al.* (2022), Gómez *et al.*, (2022), y Flores-Leñero *et al.*, (2022) utilizaron nitrato (NO₃⁻) como fuente de nitrógeno en sus condiciones de cultivo, lo que implica que las respuestas tóxicas

descritas en dichos trabajos reflejan el desempeño de *H. akashiwo* bajo una única fuente de nitrógeno. Hasta el momento, ningún estudio ha comparado directamente los efectos de diferentes fuentes de nitrógeno sobre la toxicidad de esta especie, lo que limita la comparación con nuestros resultados, donde se evaluaron adicionalmente otras dos fuentes nitrogenadas: NH_4^+ y urea.

En relación con el uso de NH_4^+ como fuente de nitrógeno, en nuestro estudio esta condición resultó particularmente tóxica para las células en ambas cepas, generando alteraciones morfológicas evidentes (**Figura 13**), sugiriendo que el contenido intracelular podría haber favorecido la acumulación de metabolitos tóxicos que intensificaron los efectos tóxicos observados en los embriones de *D. rerio* (**Figura 8**). En el caso de la cepa CCM-UdeC 279, la urea también resultó altamente tóxica a salinidades iguales o superiores a 25 PSU para los embriones. En contraste la combinación de 15 PSU con urea no produjo mortalidad, pero sí ocasionó retraso en el desarrollo y malformaciones anatómicas más pronunciadas en comparación con NO_3^- . Actualmente, no existen estudios que permitan comparar estas observaciones en condiciones equivalentes lo que limita en parte su interpretación.

Cabe destacar que la cepa CCM-UdeC 279, aislada en Nueva Zelanda hace más de cuatro décadas, mantiene una marcada capacidad tóxica, como se ha observado tanto en el estudio de Gómez *et al.* (2022), como en el presente trabajo. La persistencia de este rasgo sugiere que la toxicidad podría estar

asociada a características genéticas propias de la cepa o a atributos intrínsecos de su fisiología, los cuales se han mantenido a pesar de su prolongada mantención en condiciones de laboratorio.

7. CONCLUSIONES

- Ambas cepas de *H. akashiwo* (CCM-UdeC 225 y CCM-UdeC 279) fueron capaces de crecer en todas las combinaciones experimentales evaluadas. No obstante, el crecimiento, atributos fisiológicos y toxicidad variaron significativamente en función de la interacción entre la salinidad, la fuente de nitrógeno y la identidad de la cepa, evidenciando una marcada diferenciación a nivel intraespecífico.
- En ambas cepas de *H. akashiwo* evaluadas, la clorofila a fue el pigmento más abundante, seguida por los carotenoides totales y las clorofilas $c_1 + c_2$. Se observaron diferencias en la concentración de pigmentos entre cepas, siendo la cepa CCM-UdeC 279 la que presentó mayores niveles de clorofila a y carotenoides que la cepa CCM-UdeC 225.

- La salinidad fue el factor con mayor influencia en los parámetros fotobiológicos
- El NH_4^+ promovió una de las mayores tasas de crecimiento en la cepa CCM-UdeC 225 a 25 PSU y, simultáneamente, fue una de las fuente de nitrógeno que indujo los mayores niveles de toxicidad, provocando mortalidad total en los embriones de *D. rerio*, particularmente en salinidades intermedias y altas (25 y 35 PSU), en ambas cepas.
- La urea favoreció las mayores tasas de crecimiento en ambas cepas, con respuestas diferenciadas según la salinidad. Esta fuente de nitrógeno se asoció a efectos tóxicos severos solo en la cepa CCM-UdeC 279, incluyendo una letalidad elevada y total a salinidad igual o superiores a 25 PSU, y la presencia de anomalías morfológicas a baja salinidad (15 PSU).
- La cepa CCM-UdeC 279 presentó niveles de toxicidad considerablemente superiores a los observados en la cepa CCM-UdeC 225, tanto en mortalidad como en efectos subletales, independientemente de las condiciones evaluadas.

Estos hallazgos, resaltan la importancia de considerar simultáneamente la identidad de la cepa y las condiciones ambientales a las que las cepas pueden estar expuestas, para comprender el impacto ecológico y ecotoxicológico de esta especie en escenarios naturales. Finalmente, dado que se revelaron rasgos fisiológicos y tóxicos diferentes, entre cepas de *H. akashiwo* cultivadas en las mismas condiciones, resulta necesario abordar investigaciones futuras hacia la identificación de marcadores genéticos que permitan sustentar y explicar la variabilidad intraespecífica observada en esta especie.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, D.M., Kulis, D.M., Sullivan, J.J., Hall, S., Lee, C., (1990). Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium spp.* *Marine Biology* 104(3), 511–524. doi:10.1007/BF01314358
- Anderson, D. M., Glibert, P. M., & Burkholder, J. M. (2002). Harmful algal blooms and eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries*, 25(4), 704-726. doi:10.1007/BF02804901
- Antia, N. J., Harrison, P. J., & Oliveira, L. (1991). The role of dissolved organic nitrogen in phytoplankton nutrition, cell biology and ecology. *Phycologia*, 30(1), 1-89. doi:10.2216/i0031-8884-30-1-1.1

- Astuya, A., Ramírez, A. E., Aballay, A., Araya, J., Silva, J., Ulloa, V., & Fuentealba, J. (2015). Neurotoxin-like compounds from the ichthyotoxic red tide alga *Heterosigma akashiwo* induce a TTX-like synaptic silencing in mammalian neurons. *Harmful Algae*, 47, 1-8. doi:10.1016/j.hal.2015.04.006
- Avendaño-Herrera, R. (2018). Proper antibiotics use in the Chilean salmon industry: policy and technology bottlenecks. *Aquaculture*, 495, 803-805. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.06.072
- Barría, C., Vásquez-Calderón, P., Lizama, C., Herrera, P., Canto, A., Conejeros, P., Beltrami, O., Suárez-Isla, B. A., Carrasco, D., Rubilar, I., Guzmán, L., Durán, L. R., & Oliva, D. (2022). Spatial-temporal expansion of harmful algal blooms in Chile: A review of 65 years records. *Journal of Marine Science and Engineering*, 10(12), 1868. doi:10.3390/jmse10121868
- Bates, S. S. (1976). Effects of light and ammonium on nitrate uptake by two species of estuarine phytoplankton. *Limnology and oceanography*, 21(2), 212-218. doi:10.4319/lo.1976.21.2.0212
- Berry, J. P., Gantar, M., Gibbs, P. D. L., Schmale, M. C. (2007). The zebrafish (*Danio rerio*) embryo as a model system for identification and characterization of developmental toxins from marine and freshwater microalgae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 145(1), 61-72. doi:10.1016/j.cbpc.2006.07.011
- Bornman, E., Adams, J. B., & Strydom, N. A. (2022). Algal blooms of *Heterosigma akashiwo* and Mugilidae gill alterations. *Estuaries and Coasts*, 45(6), 1674-1687 doi:10.1007/s12237-021-01038-6
- Bouwman, L., Beusen, A., Glibert, P. M., Overbeek, C., Pawlowski, M., Herrera, J., ... & Zhou, M. (2013). Mariculture: significant and expanding cause of coastal nutrient enrichment. *Environmental Research Letters*, 8(4), 044026. doi:10.1088/1748-9326/8/4/044026
- Bowers, H. A., Tomas, C., Tengs, T., Kempton, J. W., Lewitus, A. J., & Oldach, D. W. (2006). Raphidophyceae [Chadefaud ex silva] systematics and rapid identification: sequence analyses and real-time pcr assays. *Journal of Phycology*, 42(6), 1333-1348. doi:10.1111/j.1529-8817.2006.00285.x
- Bravo, I., Fernández, M.L., Ramilo, I., Martínez, A., (2001). Toxin composition of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* isolated from different locations along the Galician coast (NW Spain). *Toxicon*, 39(10), 1537–1545. doi:10.1016/S0041-0101(01)00126-X
- Brenckman, C. M., Parameswarappa Jayalakshamma, M., Pennock, W. H., Ashraf, F., & Borgaonkar, A. D. (2025). A Review of Harmful Algal Blooms: Causes, effects, monitoring, and prevention methods. *Water*, 17(13), 1980. doi:10.3390/w17131980

- Butrón, A., Madariaga, I., & Orive, E. (2012). Tolerance to high irradiance levels as a determinant of the bloom-forming *Heterosigma akashiwo* success in estuarine waters in summer. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *107*, 141-149. doi:10.1016/j.ecss.2012.05.008
- Chang, F. H., & Page, M. (1995). Influence of light and three nitrogen sources on growth of *Heterosigma carterae* (Raphidophyceae). *New Zealand journal of marine and freshwater research*, *29*(3), 299-304. doi:10.1080/00288330.1995.9516664
- Chang, F. H., Anderson, C., & Boustead, N. C. (1990). First record of a *Heterosigma* (Raphidophyceae) bloom with associated mortality of cage-reared salmon in Big Glory Bay, New Zealand. *New Zealand journal of marine and freshwater research*, *24*(4), 461-469. doi:10.1080/00288330.1990.9516437
- Choi, C. J., Berges, J. A., & Young, E. B. (2012). Rapid effects of diverse toxic water pollutants on chlorophyll a fluorescence: variable responses among freshwater microalgae. *Water research*, *46*(8), 2615-2626. doi:10.1016/j.watres.2012.02.027
- Clark, D. R., & Flynn, K. J. (2002). N-assimilation in the noxious flagellate *Heterosigma carterae* (raphidophyceae): Dependence on light, N-source, and physiological state¹. *Journal of Phycology*, *38*(3), 503-512. doi:10.1046/j.1529-8817.2002.01082.x
- Cochlan, W. P., Trainer, V. L., Trick, C. G., Wells, M. L., Bill, B. D., & Eberhart, B. T. L. (2012). *Heterosigma akashiwo* in the Salish Sea: Defining growth and toxicity leading to fish kills. *Harmful Algae*, 203-206.
- Connell, L. B. (2000). Nuclear ITS region of the alga *Heterosigma akashiwo* (Chromophyta: Raphidophyceae) is identical in isolates from Atlantic and Pacific basins. *Marine Biology*, *136*(6), 953-960. doi:10.1007/s002270000314
- De Esch, C., Sliker, R., Wolterbeek, A., Woutersen, R., & de Groot, D. (2012). Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing: a mini review. *Neurotoxicology and Teratology*, *34*(6), 545-553.
- Demmig-Adams, B., & Adams, W. I. (1992). Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *43*, 599-626. Recuperado de doi:10.1146/annurev.pp.43.060192.003123
- Díaz, P. A., Álvarez, G., 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, R. I. (2019). Impacts of harmful algal blooms on

- the aquaculture industry: Chile as a case study. *Perspectives in Phycology*, 6: 39–50. doi:10.1127/pip/2019/0081
- Dortch, Q. (1990). The interaction between ammonium and nitrate uptake in phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 183-201. <https://www.jstor.org/stable/24842258>
- Drábková, M., Admiraal, W., & Maršálek, B. (2007). Combined exposure to hydrogen peroxide and light selective effects on cyanobacteria, green algae, and diatoms. *Environmental Science & Technology*, 41(1), 309-314. doi:10.1021/es060746i
- Eilers, P. H. C., & Peeters, J. C. H. (1988). A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecological Modelling*, 42(3-4), 199-215. doi:10.1016/0304-3800(88)90057-9
- Engesmo, A., Eikrem, W., Seoane, S., Smith, K., Edvardsen, B., Hofgaard, A., & Tomas, C. R. (2016). New insights into the morphology and phylogeny of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae), with the description of *Heterosigma minor* sp. nov. *Phycologia*, 55(3), 279-294. doi:10.2216/15-115.1
- Erratt, K. J., Creed, I. F., & Trick, C. G. (2020). Differential drawdown of ammonium, nitrate, and urea by freshwater chlorophytes and Cyanobacteria. *Journal of Phycology*, 56(2), 458-468. doi:10.1111/jpy.12960
- Fan, C., Glibert, P. M., & Burkholder, J. M. (2003). Characterization of the affinity for nitrogen, uptake kinetics, and environmental relationships for *Prorocentrum minimum* in natural blooms and laboratory cultures. *Harmful Algae*, 2(4), 283-299. doi:10.1016/S1568-9883(03)00047-7
- Flores-Leñero, A., Vargas-Torres, V., Paredes-Mella, J., Norambuena, L., Fuenzalida, G., Lee-Chang, K., & Mardones, J. I. (2022). *Heterosigma akashiwo* in Patagonian fjords: Genetics, growth, pigment signature and role of PUFA and ROS in ichthyotoxicity. *Toxins*, 14(9), 577. doi:10.3390/toxins14090577
- Franklin, L. A., & Forster, R. M. (1997). Review the changing irradiance environment: consequences for marine macrophyte physiology, productivity and ecology. *European Journal of Phycology*, 32(3), 207-232. <https://doi.org/undefined>
- Fredrickson, K. A., Strom, S. L., Crim, R., & Coyne, K. J. (2011). Interstrain variability in physiology and genetics of heterosigma akashiwo (raphidophyceae) from the west coast of North America 1. *Journal of Phycology*, 47(1), 25-35. doi:10.1111/j.1529-8817.2010.00942.x

- Glibert, P. M., Harrison, J., Heil, C., & Seitzinger, S. (2006). Escalating worldwide use of urea—a global change contributing to coastal eutrophication. *Biogeochemistry*, *77*(3), 441-463. doi:10.1007/s10533-005-3070-5
- Glibert, P. M., Wilkerson, F. P., Dugdale, R. C., Raven, J. A., Dupont, C. L., Leavitt, P. R., ... & Kana, T. M. (2016). Pluses and minuses of ammonium and nitrate uptake and assimilation by phytoplankton and implications for productivity and community composition, with emphasis on nitrogen-enriched conditions. *Limnology and Oceanography*, *61*(1), 165-197. doi:10.1002/lno.10203
- Gómez, P. I., Inostroza, I., Castro-Varela, P., Silva, J., Clément, A., Rojas, G., & Aguilera Belmonte, A. (2022). Comparison of a Chilean strain of the ichthyotoxic phytoflagellate *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) with strains from France, Spain and New Zealand. *Phycologia*, *61*(1), 7-15. doi:10.1080/00318884.2021.1991685
- Goss, R., Pinto, E. A., Wilhelm, C., & Richter, M. (2006). The importance of a highly active and Δ pH-regulated diatoxanthin epoxidase for the regulation of the PS II antenna function in diadinoxanthin cycle containing algae. *Journal of Plant Physiology*, *163*(10), 1008-1021. doi:10.1016/j.jplph.2005.09.008
- Guillard, R. R. L. (1973) Division rates. En J. R. Stein (Ed.), *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth*.
- Guillard, R. R. L., & Hargraves, P. E. (1993). *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia*, *32*(3), 234-236. doi:10.2216/i0031-8884-32-3-234.1
- Han, M. S., Kim, Y. P., & Cattolico, R. A. (2002). *Heterosigma akashiwo* (raphidophyceae) resting cell formation in batch culture: strain identity versus physiological response. *Journal of Phycology*, *38*(2), 304-317. doi:10.1046/j.1529-8817.2002.01087.x
- Haque, S. M., & Onoue, Y. (2002). Effects of salinity on growth and toxin production of a noxious phytoflagellate, *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Botanica Marina*, *45*(4). doi:10.1515/BOT.2002.036
- Hara, Y., & Chihara, M. (1987). Morphology, ultrastructure and taxonomy of the raphidophycean alga *Heterosigma akashiwo*. *The botanical magazine*, *100*(2), 151-163. doi:10.1007/BF02488320
- Harvey, E. L., Menden-Deuer, S., & Ryneanson, T. A. (2015). Persistent intra-specific variation in genetic and behavioral traits in the raphidophyte, *Heterosigma akashiwo*. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 1277. doi:10.3389/fmicb.2015.01277

- Hegaret, H., Wikfors, G. H., & Shumway, S. E. (2007). Diverse feeding responses of five species of bivalve mollusc when exposed to three species of harmful algae. *Journal of Shellfish Research*, 26(2), 549-559. doi:10.2983/0730-8000(2007)26[549:DFROFS]2.0.CO;2
- Hennige, S. J., Coyne, K. J., MacIntyre, H., Liefer, J., & Warner, M. E. (2013). The photobiology of *Heterosigma akashiwo*. Photoacclimation, diurnal periodicity, and its ability to rapidly exploit exposure to high light. *Journal of Phycology*, 49(2), 349-360. doi:10.1111/jpy.12043
- Herndon, J., & Cochlan, W. P. (2007). Nitrogen utilization by the raphidophyte *Heterosigma akashiwo*: growth and uptake kinetics in laboratory cultures. *Harmful Algae*, 6(2), 260-270. doi:10.1016/j.hal.2006.08.006
- Honjo, T. (1992). Harmful red tides of *Heterosigma akashiwo*. *NOAA Technical Report NMFS*, 111, 27-32.
- Hulburt, E. M. (1965). Flagellates from brackish waters in the vicinity of Woods Hole, Massachusetts. *Journal of Phycology*, 1(2), 87-94. doi:10.1111/j.1529-8817.1965.tb04563.x
- Hutchinson, T.H., Scholz, N., Guhl, W. (1998). Analysis of the ECETOC aquatic toxicity (EAT) database IV-comparative toxicity of chemical substances to freshwater versus saltwater organisms. *Chemosphere*, 36(1), 143-153. doi:10.1016/S0045-6535(97)10026-1
- Ihnken, S., Eggert, A., & Beardall, J. (2010). Exposure times in rapid light curves affect photosynthetic parameters in algae. *Aquatic Botany*, 93(3), 185-194. doi:10.1016/j.aquabot.2010.07.002
- Ikeda, C. E., Cochlan, W. P., Bronicheski, C. M., Trainer, V. L., & Trick, C. G. (2016). The effects of salinity on the cellular permeability and cytotoxicity of *Heterosigma akashiwo*. *Journal of Phycology*, 52(5), 745-760. doi:10.1111/jpy.12433
- Imai, I., Itakura, S. & Ito, K. (1993). Cysts of the red tide flagellate *Heterosigma akashiwo*, Raphidophyceae, found in bottom sediments of northern Hiroshima Bay, Japan. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 59(10), 1669-1674. doi:10.2331/suisan.59.1669
- Imberger, J., Berman, T., Christian, R. R., Sherr, E. B., Whitney, D. E., Pomeroy, L. R. & Wiebe, W. J. (1983). The influence of water motion on the distribution and transport of materials in a salt marsh estuary. *Limnology and Oceanography*, 28(2), 201-214. doi:10.4319/lo.1983.28.2.0201
- Iriarte, J. L., González, H. E., & Nahuelhual, L. (2010). Patagonian fjord ecosystems in southern Chile as a highly vulnerable region: problems and needs. *Ambio*, 39(7), 463-466. doi:10.1007/s13280-010-0049-9

- Iriarte, J. L., Pantoja, S., & Daneri, G. (2014). Oceanographic processes in Chilean fjords of Patagonia: from small to large-scale studies. *Progress in Oceanography*, 129, 1-7. doi:10.1016/j.pocean.2014.10.004
- Iriarte, J. L., Pizarro, G., & Frangopulos, M. (2023). Harmful algal blooms in Patagonian fjords and channels systems: Recent advances, gaps, and priorities in a changing ocean. *Progress in Oceanography*, 217, 103087. doi:10.1016/j.pocean.2023.103087
- Ji, N., Zhang, Z., Huang, J., Zhou, L., Deng, S., Shen, X., & Lin, S. (2020). Utilization of various forms of nitrogen and expression regulation of transporters in the harmful alga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Harmful Algae*, 92, 101770. doi:10.1016/j.hal.2020.101770
- Kamiyama, T., Nagai, S., Suzuki, T., Miyamura, K., (2010). Effect of temperature on production of okadaic acid, dinophysistoxin-1, and pectenotoxin-2 by *Dinophysis acuminata* in culture experiments. *Aquatic Microbial Ecology*. 60(2), 193–202. doi:10.3354/ame01419
- Kempton, J., Keppler, C. J., Lewitus, A., Shuler, A., & Wilde, S. (2008). A novel *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) bloom extending from a South Carolina bay to offshore waters. *Harmful Algae*, 7(2), 235-240. doi:10.1016/j.hal.2007.08.003
- Khan, S., Arakawa, O., & Onoue, Y. (1997). Neurotoxins in a toxic red tide of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) in Kagoshima Bay, Japan. *Aquaculture Research*, 28(1), 9-14. doi:10.1046/j.1365-2109.1997.t01-1-00823.x
- Kohata, K., & Watanabe, M. (1986). Synchronous division and the pattern of diel vertical migration of *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada (Raphidophyceae) in a laboratory culture tank. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 100(1-3), 209-224. doi:10.1016/0022-0981(86)90163-2
- Kok, J. W. K., Yeo, D. C. J. & Leong, S.C.Y. (2015). Growth and physiological responses of a tropical toxic marine microalga *Heterosigma akashiwo* (Heterokontophyta: Raphidophyceae) from Singapore waters to varying nitrogen sources and light conditions. *Ocean Science Journal*, 50, 491–508. doi:10.1007/s12601-015-0045-x
- Lakeman, M. B., Von Dassow, P., & Cattolico, R. A. (2009). The strain concept in phytoplankton ecology. *Harmful Algae*, 8(5), 746-758. doi:10.1016/j.hal.2008.11.011
- Larkum, A. W., Grossman, A. R., & Raven, J. A. (Eds.). (2020). *Photosynthesis in algae: biochemical and physiological mechanisms*. Dordrecht: Springer.

- Lee, J. W., Na, D. S., Ju, B. K. (2007). Zebrafish chorion as an extracellular matrix for cell culture. In *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2006. August 27–September 1, 2006 COEX Seoul, Korea “Imaging the Future Medicine”* (pp. 3379-3381). Berlin: Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.. Doi:10.1007/978-3-540-36841-0_855
- L'Helguen, S., Maguer, J. F., & Caradec, J. (2008). Inhibition kinetics of nitrate uptake by ammonium in size-fractionated oceanic phytoplankton communities: implications for new production and f-ratio estimates. *Journal of Plankton Research*, 30(10), 1179-1188. doi:10.1093/plankt/fbn072
- Li, P., Ma, Q., Xu, S., Liu, W., Ma, Z., & Ni, G. (2021). Opposite growth responses of *Alexandrium minutum* and *Alexandrium catenella* to photoperiods and temperatures. *Plants*, 10(6), 1056. doi:10.3390/plants10061056
- Ling, C., & Trick, C. G. (2010). Expression and standardized measurement of hemolytic activity in *Heterosigma akashiwo*. *Harmful Algae*, 9(5), 522-529. doi:10.1016/j.hal.2010.04.004
- Llanos-Rivera, A., Álvarez-Muñoz, K., Astuya-Villalón, A., López-Rosales, L., García-Camacho, F., Sánchez-Mirón, A., Krock, B., & Gallardo-Rodríguez, J. J. (2023). Sublethal effect of the toxic dinoflagellate *Karlodinium veneficum* on early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Pollution Research*, 30(10), 27113–27124. doi:10.1007/s11356-022-24149-4
- Lomas, M. W., & Glibert, P. M. (1999). Interactions between NH_4^+ and NO_3^- uptake and assimilation: comparison of diatoms and dinoflagellates at several growth temperatures. *Marine Biology*, 133(3), 541-551. doi:10.1007/s002270050494
- Maguer, J. F., L'Helguen, S., Madec, C., Labry, C., & Le Corre, P. (2007). Nitrogen uptake and assimilation kinetics in *Alexandrium minutum* (dynophyceae): effect of n-limited growth rate on nitrate and ammonium interactions. *Journal of Phycology*, 43(2), 295-303. doi:10.1111/j.1529-8817.2007.00334.x
- Manna, S., Firdous, S. M. (2025). Unravelling the developmental toxicity of heavy metals using zebrafish as a model: a narrative review. *Biometals*, 38(2), 419–463. doi:10.1007/s10534-025-00671-z
- Mardones, J. I. (2020). Screening of Chilean fish-killing microalgae using a gill cell-based assay. *Latin american journal of aquatic research*, 48(2), 329-335. doi:10.3856/vol48-issue2-fulltext-2400
- Mardones, J. I., Paredes-Mella, J., Flores-Leñero, A., Yarimizu, K., Godoy, M., Artal, O., ... & Iriarte, J. L. (2023). Extreme harmful algal blooms, climate change, and potential risk of eutrophication in Patagonian fjords: Insights

- from an exceptional *Heterosigma akashiwo* fish-killing event. *Progress in Oceanography*, 210, 102921. doi:10.1016/j.pocean.2022.102921
- Mardones, J., Clement, A., & Rojas, X. (2012). Monitoring potentially ichthyotoxic phytoflagellates in southern fjords of Chile. *Harmful Algae News*, 45, 6-7.
- 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. *Journal of plankton research*, 32(4), 529-538. doi:10.1093/plankt/fbp135
- Matheson, J. R., Ikeda, C. E., Trick, C. G., & Cochlan, W. P. (2014). The effects of acidity and nutrient stress on the toxicity of *Heterosigma akashiwo*. In *Proceedings of the 16th International Conference on Harmful Algae held in Wellington, New Zealand* (Vol. 27, pp. 78-82).
- Moreno Fernandez, M. (2013). Mantenimiento en el laboratorio del pez cebra (Danio rerio). <http://hdl.handle.net/10810/10642>
- Muller, P., Li, X. P., & Niyogi, K. K. (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*, 125(4), 1558-1566. doi:10.1104/pp.125.4.1558
- Neilson, A. H., & Larsson, T. (1980). The utilization of organic nitrogen for growth of algae: physiological aspects. *Physiologia plantarum*, 48(4), 542-553. doi:10.1111/j.1399-3054.1980.tb03302.x
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S. I., & Murata, N. (2006). A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1757(7), 742-749. doi:10.1016/j.bbabi.2006.05.013
- Oda, T., Nakamura, A., Shikayama, M., Kawano, I., Ishimatsu, A., & Muramatsu, T. (1997). Generation of reactive oxygen species by raphidophycean phytoplankton. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 61(10), 1658-1662. doi:10.1271/bbb.61.1658
- Ono, K., Khan, S., & Onoue, Y. (2000). Effects of temperature and light intensity on the growth and toxicity of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Aquaculture Research*, 31(5), 427-433. doi:10.1046/j.1365-2109.2000.00463.x
- Osmond, C. B., & Grace, S. C. (1995). Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis?. *Journal of Experimental Botany*, 46(special_issue), 1351-1362. doi:10.1093/jxb/46.special_issue.1351

- Ou, L., Cai, Y., Jin, W., Wang, Z., & Lu, S. (2018). Understanding the nitrogen uptake and assimilation of the Chinese strain of *Aureococcus anophagefferens* (Pelagophyceae). *Algal research*, 34, 182-190. doi:10.1016/j.algal.2018.07.019
- Pantoja, S., Iriarte, J. L., & Daneri, G. (2011). Oceanography of the Chilean Patagonia. *Continental shelf research*, 31(3-4), 149-153. doi:10.1016/j.csr.2010.10.013
- Parkhill, J. P., Maillet, G., & Cullen, J. J. (2001). Fluorescence-based maximal quantum yield for PSII as a diagnostic of nutrient stress. *Journal of Phycology*, 37(4), 517-529.
- Parra, O.O., Rivera P. R., Floyd G. L. & Wilcox L. W. (1991), Culture, morphology, ultrastructure and taxonomy of a phytoflagellate associated to a local red tide in Chile: *Heterosigma akashiwo* (Hada)Hada. *Gayana Botanica* 48(1-4), 101-110
- Philip, J. R. (1958). The Osmotic Cell, Solute Diffusibility, and the Plant Water Economy. *Plant Physiology*, 33(4), 264. doi:10.1104/pp.33.4.264
- Porretti M., Arrigo F., Di Bella G., Faggio C. (2022). Impact of pharmaceutical products on zebrafish: An effective tool to assess aquatic pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 261, 109439. doi:10.1016/j.cbpc.2022.109439
- Ruban, A. V. (2015). *Evolution under the sun: optimizing light harvesting in photosynthesis*. *Journal of experimental botany*, 66(1), 7-23. doi:10.1093/jxb/eru400
- Sandoval-Sanhueza, A., Aguilera-Belmonte, A., Basti, L., Figueroa, R. I., Molinet, C., Álvarez, G., ... & Díaz, P. A. (2022). Interactive effects of temperature and salinity on the growth and cytotoxicity of the fish-killing microalgal species *Heterosigma akashiwo* and *Pseudochattonella verruculosa*. *Marine Pollution Bulletin*, 174, 113234. doi:10.1016/j.marpolbul.2021.113234
- Schreiber, U., Müller, J. F., Haugg, A., & Gademann, R. (2002). New type of dual-channel PAM chlorophyll fluorometer for highly sensitive water toxicity biotests. *Photosynthesis research*, 74(3), 317-330. doi:10.1023/A:1021276003145
- Shikata, T., Matsunaga, S., Nishide, H., Sakamoto, S., Onistuka, G., & Yamaguchi, M. (2015). Diurnal vertical migration rhythms and their photoresponse in four phytoflagellates causing harmful algal blooms. *Limnology and Oceanography*, 60(4), 1251-1264. doi:10.1002/lno.10095

- Sigee, D. C. (2005). *Freshwater Microbiology: Biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment*. John Wiley & Sons.
- Smayda, T. J. (1998). Ecophysiology and bloom dynamics of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Physiological ecology of harmful algal blooms*, 113-131.
- Smayda, T. J. (2000). Ecological features of harmful algal blooms in coastal upwelling ecosystems. *African Journal of Marine Science*, 22. <https://www.ajol.info/index.php/ajms/article/view/67625>
- Solomon, C. M., Collier, J. L., Berg, G. M., & Glibert, P. M. (2010). Role of urea in microbial metabolism in aquatic systems: a biochemical and molecular review. *Aquatic Microbial Ecology*, 59(1), 67-88. doi:10.3354/ame01390
- Strähle, U., Scholz, S., Geisler, R., Greiner, P., Hollert, H., Rastegar, S., ... & Braunbeck, T. (2012). Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments—A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reproductive Toxicology*, 33(2), 128-132. doi:10.1016/j.reprotox.2011.06.121
- Strom, S. L., Harvey, E. L., Fredrickson, K. A., & Menden-Deuer, S. (2013). Broad salinity tolerance as a refuge from predation in the harmful raphidophyte alga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Journal of Phycology*, 49(1), 20-31. doi:10.1111/jpy.12013
- Jit, M. S., Ichimi, K., Hamada, K., Yamada, M., Tada, K. & Harrison, P.J. (2009): Ammonium accelerates the growth rate of *Skeletonema spp.* in the phytoplankton assemblage in a heavily eutrophic embayment, Dokai Bay, Japan. *La mer*, 47, 89-101.
- Tada, K., Suksomjit, M., Ichimi, K., Funaki, Y., Montani, S., Yamada, M., & Harrison, P. J. (2009). Diatoms grow faster using ammonium in rapidly flushed eutrophic Dokai Bay, Japan. *Journal of oceanography*, 65(6), 885-891. doi:10.1007/s10872-009-0073-1
- Tango, P., Butler, W., Wazniak, C., & Hall, M. (2004). Assessment of harmful algae bloom species in the Maryland Coastal Bays. *Maryland's Coastal Bays Ecosystem Health Assessment*, 8-2
- Taylor, F. J. R. (1993). The ecology of fish-killing blooms of the chloromonad flagellate *Heterosigma* in the Strait of Georgia and adjacent waters. *Toxic phytoplankton blooms in the sea*, 705-710.
- Tian S., Teng M., Meng Z., Yan S., Jia M., Li R., Liu L., Yan J., Zhou Z., Zhu W. (2019). Toxicity effects in zebrafish embryos (*Danio rerio*) induced by

- prothioconazole. *Environmental Pollution* 255, 113269. doi:10.1016/j.envpol.2019.113269
- Tong, M., Kulis, D.M., Fux, E., Smith, J.L., Hess, P., Zhou, Q., Anderson D.M., (2011). The effects of growth phase and light intensity on toxin production by *Dinophysis acuminata* from the northeastern United States. *Harmful Algae* 10(3), 254-264. doi:10.1016/j.hal.2010.10.005
- Twiner, M. J., Dixon, S. J., & Trick, C. G. (2004). Extracellular organics from specific cultures of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) irreversibly alter respiratory activity in mammalian cells. *Harmful Algae*, 3(2), 173-182. doi:10.1016/j.hal.2003.10.003
- Ugarte, A., Romero, J., Farías, L., Sapiains, R., Aparicio-Rizzo, P., Ramajo, L., ... & Williams, C. (2022). *Marea roja y cambio global: Elementos para la construcción de una gobernanza integrada de las Floraciones de Algas Nocivas (FAN)*. Centro de Ciencia del Clima y la Resiliencia (CR), 2.
- Wagner, H., Jakob, T., & Wilhelm, C. (2006). Balancing the energy flow from captured light to biomass under fluctuating light conditions. *New Phytologist*, 169(1). doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01550.x
- Walne, P. R. (1970). Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. *Fishery Investigations. Series II*, 26(5).
- Wang, Y., Cui, L., Feng, C., Dong, Z., Fan, W., Peijnenburg, W. J. G. M., (2021). Taxon-toxicity study of fish to typical transition metals: Most sensitive species are edible fish. *Environmental Pollution*. 284, 117154. doi:10.1016/j.envpol.2021.117154
- Wegmann, K., & Metzner, H. (1971). Synchronization of *Dunaliella* cultures. *Archiv für Mikrobiologie*, 78(4), 360-367.
- Weidemann, S. S., Arigony-Neto, J., Jaña, R., Netto, G., Gonzalez, I., Casassa, G., & Schneider, C. (2020). Recent climatic mass balance of the Schiaparelli Glacier at the Monte Sarmiento Massif and reconstruction of Little Ice Age climate by simulating steady-state glacier conditions. *Geosciences*, 10(7), 272. doi:10.3390/geosciences10070272
- Yang, C. Z., Albright, L. J., & Yousif, A. N. (1995). Oxygen-radical-mediated effects of the toxic phytoplankter *Heterosigma carterae* on juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 23, 101-108. doi:10.3354/dao023101

9. ANEXO

9.1 Células de *H. akashiwo* de la cepa CCM-UdeC 225 y CCM-UdeC 279 en tratamientos con urea a 15 PSU y NH_4^+ a 15 PSU.

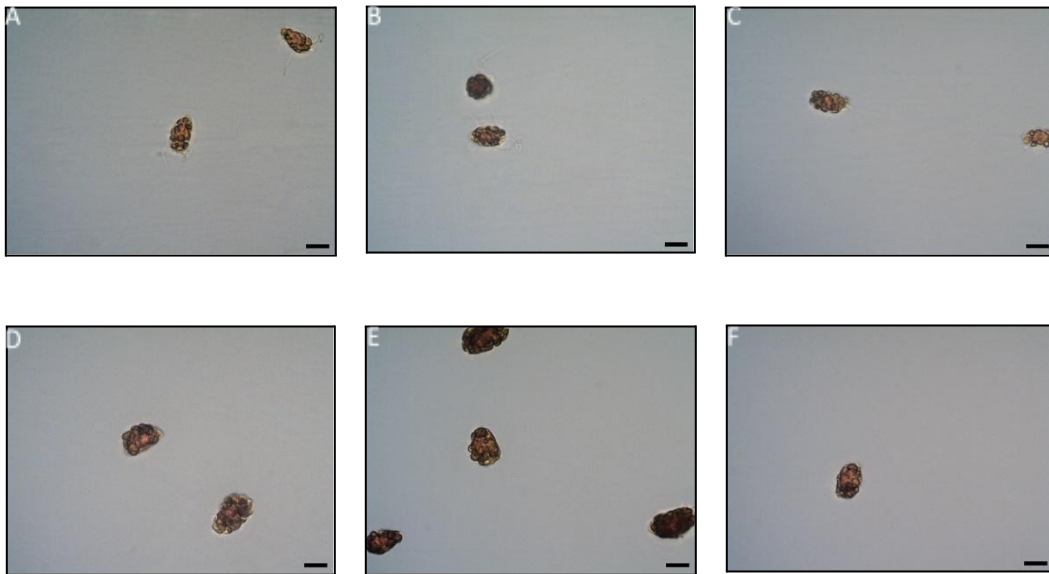


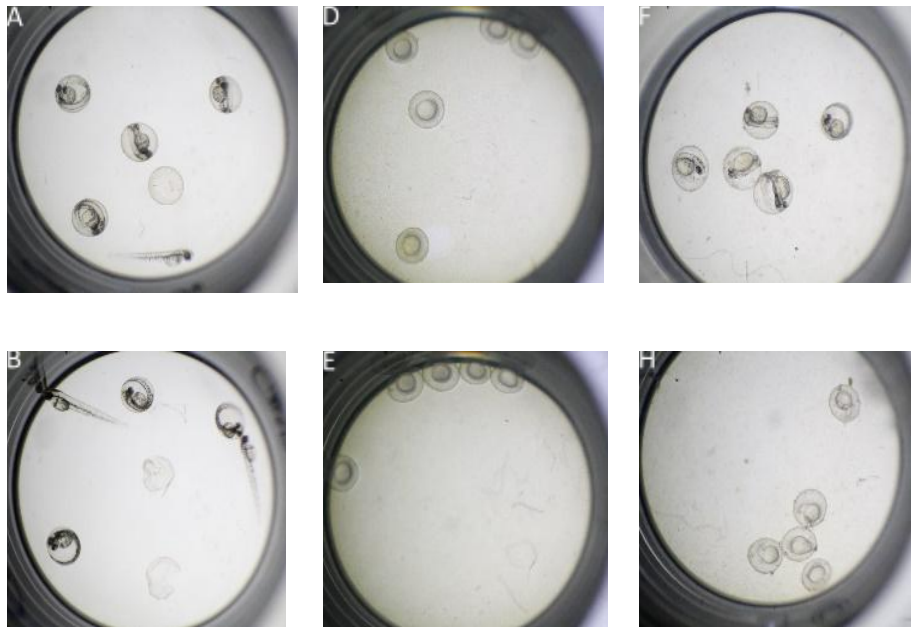
Figura 11. Células de *H. akashiwo* de la cepa CCM-UdeC 225 (A, B y C) y CCM-UdeC 279 (D, E y F), cultivadas en tratamientos con urea a 15 PSU. La barra de escala corresponden a 10 μm (células fijadas con Lugol)





Figura 12. Células de *H. akashiwo* de la cepa CCM-UdeC 225 (**A**, **B** y **C**) y CCM-UdeC 279 (**D**, **E** y **F**), cultivadas en tratamientos con NH_4^+ a 15 PSU. La barra de escala corresponden a 10 μm (células fijadas con Lugol).

9.2 Exposición de embriones de *Danio rerio* a extracto *H. akashiwo* (CCM-UdeC 225).



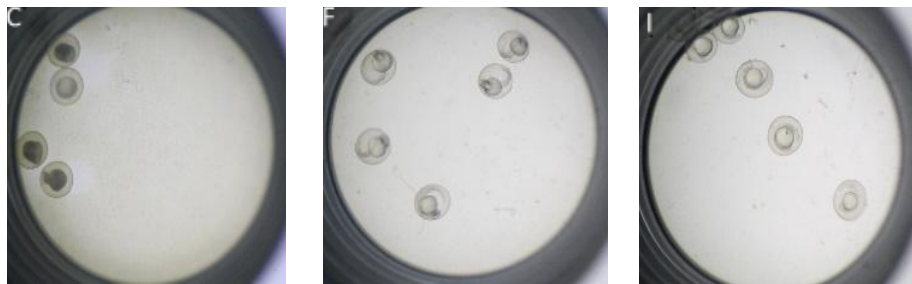


Figura 13. Bioensayo con embriones de *Danio rerio* expuestos a extracto de la cepa CCM-UdeC 225 (aumento 1.25x). **A)** Extracto de *T. tetrahele*, **B)** Medio de cultivo control (E3) 1X, **C)** Extracto del tratamiento con NH_4^+ a 35 PSU, **D)** NO_3^- a 15 PSU, **E)** NO_3^- a 25 PSU, **F)** NO_3^- a 35 PSU, **G)** urea a 15 PSU, **H)** urea a 25 PSU y **I)** urea a 35 PSU. Imágenes correspondientes a las primeras 48 hrs de exposición.

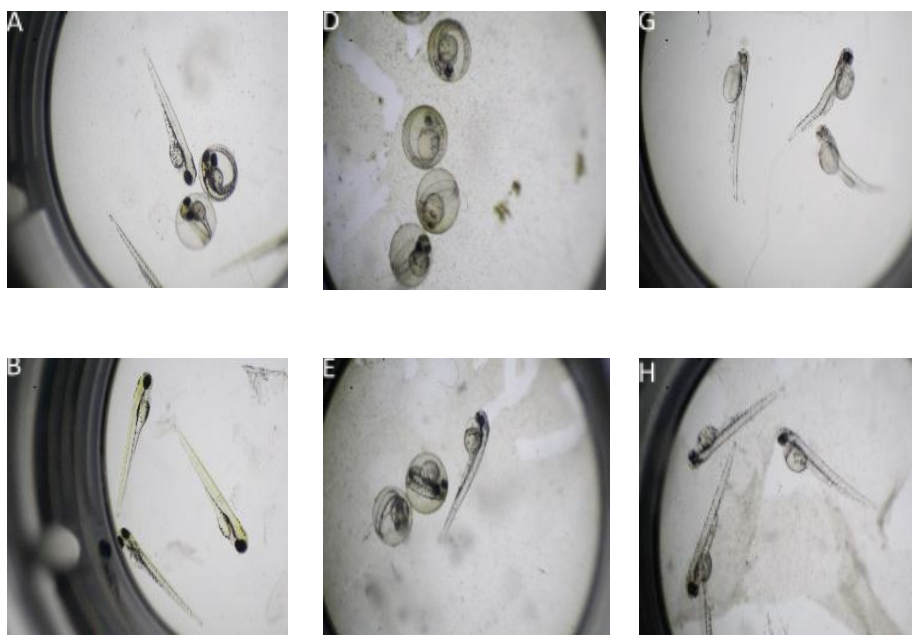
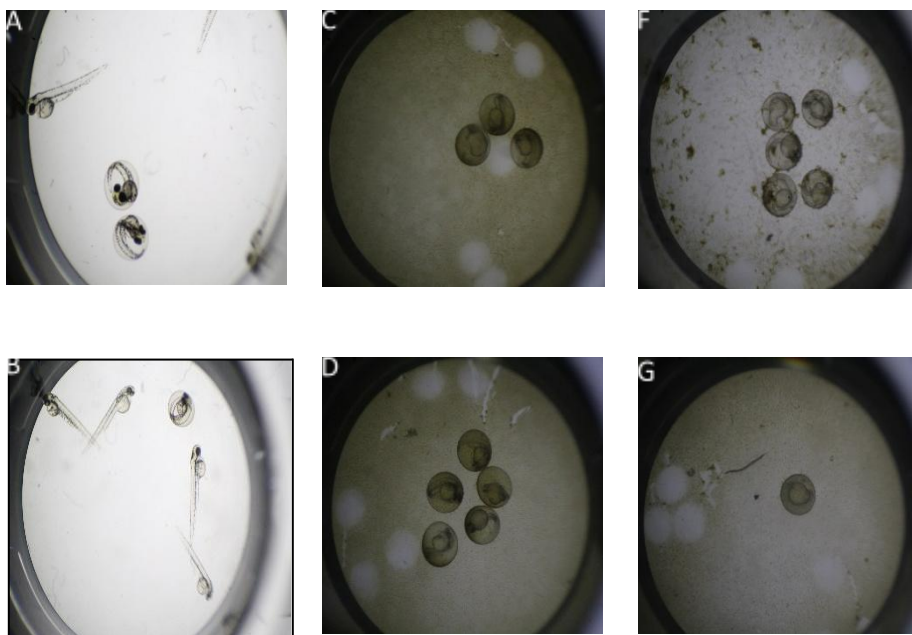




Figura 14. Bioensayo con embriones de *Danio rerio* expuestos a extracto de la cepa CCM-UdeC 225 (aumento 2.0x). **A)** Extracto de *T. tetrahele*, **B)** Medio de cultivo control (EM), **C)** Extracto del tratamiento con NH_4^+ a 35 PSU, **D)** NO_3^- a 15 PSU, **E)** NO_3^- a 25 PSU, **F)** NO_3^- a 35 PSU, **G)** urea a 15 PSU, **H)** urea a 25 PSU y **I)** urea a 35 PSU. Imágenes correspondientes a las primeras 72 hrs de exposición.

9.3 Exposición de embriones de *Danio rerio* a extracto *H. akashiwo* (CCM-UdeC 279).



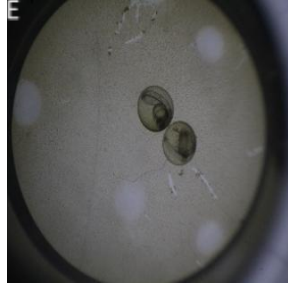
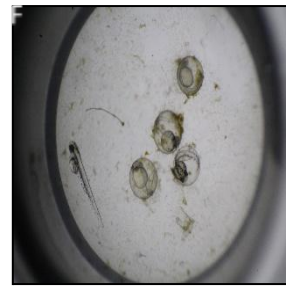
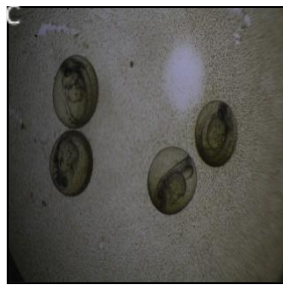
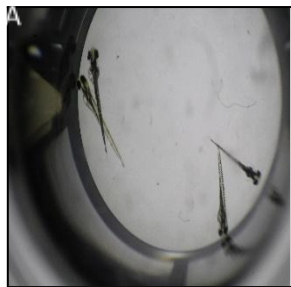


Figura 15. Bioensayo con embriones de *Danio rerio* expuestos a extracto de la cepa CCM-UdeC 279 (aumento 1.25x- 1.5x). **A)** Extracto de *T. tetrahele*, **B)** Medio de cultivo control (EM), **C)** Extracto del tratamiento con NO_3^- a 15 PSU, **D)** NO_3^- a 25 PSU, **E)** NO_3^- a 35 PSU, **F)** urea a 15 PSU y **G)** urea a 35 PSU. Imágenes correspondientes a las primeras 48 hrs de exposición.



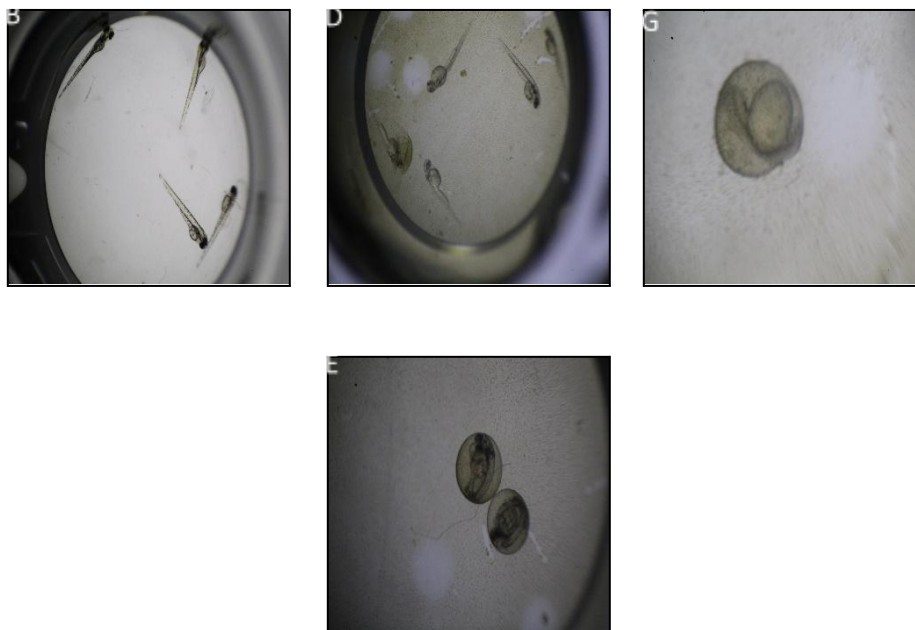


Figura 16. Bioensayo con embriones de *Danio rerio* expuestos a extracto de la cepa CCM-UdeC 225 (aumento 1.25-2.0x). **A)** Extracto de *T. tetrathele*, **B)** medio de cultivo control (EM), **C)** NO_3^- a 15 PSU, **D)** NO_3^- a 25 PSU, **E)** NO_3^- a 35 PSU, **F)** urea a 15 PSU y **G)** urea a 35 PSU. Imágenes correspondientes a las primeras 72 hrs de exposición.

Tabla 4. Efectos subletales de embriones de *D. rerio* expuestos durante 72 horas a extractos de *H. akashiwo*. Se reportan el porcentaje de éxito de eclosión y las anomalías (retraso en el desarrollo y edemas) en embriones y larvarias sobrevivientes de cada ensayo. Se incluyeron medio E3 y extracto de *T. tetrathele* como controles en cada ensayo. Cada tratamiento incluyó inicialmente 30 huevos en fase de gastrulación (6 réplicas, 5 huevos cada una).

Cepa	Tratamientos	Total de individuos vivos (72hpExp)	% Promedio eclosión (72hpExp)	% Promedio retraso en el desarrollo (72hpExp)	% Promedio edemas (72hpExp)
CCM-UdeC 225 (Placa 1)	Medio E3 (control)	30	90	3,3	0
CCM-UdeC 225 (Placa 1)	<i>T. tetrathele</i> (control)	30	80	3,3	0
CCM-UdeC 225 (Placa 1)	35PSU NH_4^+	2	0	100	0
CCM-UdeC 225 (Placa 1)	15PSU NO_3^-	23	0	76	0
CCM-UdeC 225 (Placa 1)	25PSU NO_3^-	25	4,2	86,1	0

CCM-UdeC 225 (Placa 1)	35PSU NO ₃ ⁻	30	3,3	13,1	0
CCM-UdeC 225 (Placa 2)	Medio E3 (control)	30	100	0	0
CCM-UdeC 225 (Placa 2)	<i>T. tetrathele</i> (control)	30	83,3	3,3	0
CCM-UdeC 225 (Placa 2)	15PSU Urea	26	19,2	39,1	3,3
CCM-UdeC 225 (Placa 2)	25PSU Urea	30	13,3	76,6	0
CCM-UdeC 225 (Placa 2)	35PSU Urea	30	10	33,3	0

CCM-UdeC 279 (Placa 1)	Medio E3 (control)	30	83,3	0	0
CCM-UdeC 279 (Placa 1)	<i>T. tetrathele</i> (control)	28	100	0	0
CCM-UdeC 279 (Placa 1)	15PSU NO ₃ ⁻	7	0	100	100
CCM-UdeC 279 (Placa 1)	25PSU NO ₃ ⁻	9	0	100	77,5
CCM-UdeC 279 (Placa 1)	35PSU NO ₃ ⁻	2	0	100	100
CCM-UdeC 279 (Placa 2)	Medio E3 (control)	30	90	0	0
CCM-UdeC 279 (Placa 2)	<i>T. tetrathele</i> (control)	30	90	0	0
CCM-UdeC 279 (Placa 2)	15PSU Urea	30	30	96,7	53,3
CCM-UdeC 279 (Placa 2)	35PSU Urea	1	0	100	100

9.4 Análisis estadístico

Tabla 5. Códigos utilizados para la identificación de los factores incluidos en el análisis estadístico. Se indican las cepas de *Heterosigma akashiwo* evaluadas (CCM-UdeC 225 y CCM-UdeC 279), las fuentes de nitrógeno empleadas (NH₄⁺, NO₃⁻ y urea) y los niveles de salinidad (15, 25 y 35 PSU), junto con sus respectivos códigos numéricos.

Univariate Tests of Significance for Kmax (Spreadsheet1kmax) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	124.4462	1	124.4462	14916.26	0.000000
Cepa	1.9281	1	1.9281	231.10	0.000000
Fuente N	0.3549	2	0.1774	21.27	0.000000
Salinidad	0.0988	2	0.0494	5.92	0.004740
Cepa*Fuente N	0.2770	2	0.1385	16.60	0.000002
Cepa*Salinidad	0.0795	2	0.0398	4.77	0.012412
Fuente N*Salinidad	0.6839	4	0.1710	20.49	0.000000
Cepa*Fuente N*Salinidad	1.5953	4	0.3988	47.80	0.000000
Error	0.4505	54	0.0083		

Newman-Keuls test: variable Kmax (Spreadsheet1kmax) Homogenous Groups, alpha = .05000 (Non-Exhaustive Search) Error: Between MS = .00834, df = 54.000													
Cell No.	Cepa	Fuente N	Salinidad	Kmax Mean	a	b	c	d	e	f	g	h	i
3	1	1	3	0.892365	****								
4	1	2	1	1.010785	****	****							
5	1	2	2	1.010785	****	****							
8	1	3	2	1.076037	****	****	****						
18	2	3	3	1.175551				****	****	****			
7	1	3	1	1.188716				****	****	****	****		
11	2	1	2	1.218938					****	****	****		
1	1	1	1	1.221244						****	****	****	
13	2	2	1	1.255480							****	****	****
6	1	2	3	1.255883								****	****
10	2	1	1	1.311763									****
9	1	3	3	1.313938									****
2	1	1	2	1.389716									****
12	2	1	3	1.433426									****
14	2	2	2	1.585382									****
15	2	2	3	1.614929									****
16	2	3	1	1.792767									****
17	2	3	2	1.916779									****

Figura 18. A) Resultados del análisis de varianza de tres vías (ANOVA) aplicado a la tasa de crecimiento, Kmax (divisiones d⁻¹) de los cultivos de *H. akashiwo*. **B)** Resultados del análisis de post hoc de Student-Newman-Keuls para tasa de crecimiento, Kmax (divisiones d⁻¹). La tabla muestra la comparación múltiple entre los distintos tratamientos, considerando las combinaciones de cepa, fuente de nitrógeno y salinidad. Las diferencias significativas entre medias se indican mediante agrupaciones con letras distintas (p < 0,05).

PIGMENTOS

Univariate Tests of Significance for Clorofila a (µg/L cultivo) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	51795005	1	51795005	7006.528	0.000000
Cepa	7802757	1	7802757	1055.512	0.000000
Fuente N	8162484	2	4081242	552.087	0.000000
Salinidad	2155762	2	1077881	145.809	0.000000
Cepa*Fuente N	4000176	2	2000088	270.560	0.000000
Cepa*Salinidad	521093	2	260547	35.245	0.000000
Fuente N*Salinidad	2322363	4	580591	78.539	0.000000
Cepa*Fuente N*Salinidad	586946	4	146737	19.850	0.000000
Error	399189	54	7392		

Newman-Keuls test: variable Clorofila a (µg/L cultivo) Homogenous Groups, alpha = .05000 (Non-Exhaustive Search) Error: Between MS = 7392.4, df = 54.000													
Cell No.	Cepa	Fuente N	Salinidad	Clorofila a (µg/L cultivo) Mean	a	b	c	d	e	f	g	h	i
6	1	2	3	278.133	****								
10	2	1	1	282.477	****								
2	1	1	2	328.631	****	****							
7	1	3	1	337.532	****	****							
3	1	1	3	381.505	****	****	****						
1	1	1	1	410.069	****	****	****	****					
11	2	1	2	481.676					****	****			
12	2	1	3	495.100						****	****		
9	1	3	3	544.842							****	****	
5	1	2	2	672.571								****	****
8	1	3	2	843.833									****
4	1	2	1	873.536									****
18	2	3	3	875.730									****
15	2	2	3	1101.055									****
16	2	3	1	1402.588									****
17	2	3	2	1654.446									****
13	2	2	1	2142.280									****
14	2	2	2	2160.874									****

Figura 19. A) Resultados del análisis de varianza de tres vías (ANOVA) aplicado a clorofila a (µg/L cultivo) de los cultivos de *H. akashiwo*. **B)** Resultados del análisis de post hoc de Student-Newman-Keuls para clorofila a (µg/L cultivo). La tabla muestra la comparación múltiple entre los distintos tratamientos, considerando las combinaciones de cepa, fuente de nitrógeno y salinidad. Las diferencias significativas entre medias se indican mediante agrupaciones con letras distintas (p < 0,05).

A

Effect	Univariate Tests of Significance for Clorofila c1+c2 (ug/L cultivo)				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	926598,7	1	926598,7	881,3350	0,000000
Cepa	114071,4	1	114071,4	108,4991	0,000000
Fuente N	128189,2	2	64094,6	60,9636	0,000000
Salinidad	38223,4	2	19111,7	18,1781	0,000001
Cepa*Fuente N	106041,1	2	53020,6	50,4305	0,000000
Cepa*Salinidad	33241,2	2	16620,6	15,8087	0,000004
Fuente N*Salinidad	33748,7	4	8437,2	8,0250	0,000037
Cepa*Fuente N*Salinidad	6533,3	4	1633,3	1,5535	0,199984
Error	56773,3	54	1051,4		

B

Cell No.	Cepa	Fuente N	Salinidad	Clorofila c1+c2 (ug/L cultivo)	Newman-Keuls test: variable Clorofila c1+c2 (ug/L cultivo)						
					Mean	a	b	c	d	e	f
12	2	1	3	16,8388	****						
2	1	1	2	35,7638	****	****					
5	1	2	2	36,1565	****	****					
11	2	1	2	39,4616	****	****					
6	1	2	3	51,7011	****	****	****				
1	1	1	1	64,8480	****	****	****	****			
7	1	3	1	65,7412	****	****	****	****			
10	2	1	1	74,3569	****	****	****	****			
9	1	3	3	75,4165	****	****	****	****			
3	1	1	3	94,0053	****	****	****	****			
18	2	3	3	95,1145	****	****	****	****			
4	1	2	1	113,1387	****	****	****	****	****		
8	1	3	2	125,9881	****	****	****	****	****		
15	2	2	3	167,0037	****	****	****	****	****		
17	2	3	2	225,4654	****	****	****	****	****	****	
16	2	3	1	232,9827	****	****	****	****	****	****	****
14	2	2	2	243,2283	****	****	****	****	****	****	****
13	2	2	1	284,7718	****	****	****	****	****	****	****

Figura 20. A) Resultados del análisis de varianza de tres vías (ANOVA) aplicado a clorofila c1+c2 (µg/L cultivo) de los cultivos de *H. akashiwo*. **B)** Resultados del análisis de post hoc de Student-Newman-Keuls para la clorofila c1+c2 (µg/L cultivo). La tabla muestra la comparación múltiple entre los distintos tratamientos, considerando las combinaciones de cepa, fuente de nitrógeno y salinidad. Las diferencias significativas entre medias se indican mediante agrupaciones con letras distintas (p < 0,05).

A

Effect	Univariate Tests of Significance for Carotenoides (ug/L cultivo)				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	20302438	1	20302438	7466,609	0,000000
Cepa	3116583	1	3116583	1146,183	0,000000
Fuente N	2997746	2	1498873	551,239	0,000000
Salinidad	759815	2	379907	139,718	0,000000
Cepa*Fuente N	1486195	2	743098	273,288	0,000000
Cepa*Salinidad	160404	2	80202	29,496	0,000000
Fuente N*Salinidad	867752	4	216938	79,783	0,000000
Cepa*Fuente N*Salinidad	242774	4	60693	22,321	0,000000
Error	146831	54	2719		

B

Cell No.	Cepa	Fuente N	Salinidad	Carotenoides (ug/L cultivo)	Newman-Keuls test: variable Carotenoides (ug/L cultivo)										
					Mean	a	b	c	d	e	f	g	h	i	
6	1	2	3	185,960	****										
10	2	1	1	192,413	****										
2	1	1	2	199,467	****										
3	1	1	3	237,020	****	****									
7	1	3	1	240,520	****	****									
1	1	1	1	249,413	****	****									
11	2	1	2	292,267	****	****									
9	1	3	3	325,960	****	****									
12	2	1	3	335,920	****	****									
5	1	2	2	389,427	****	****									
4	1	2	1	502,227	****	****	****								
8	1	3	2	576,680	****	****	****	****							
18	2	3	3	593,280	****	****	****	****	****						
15	2	2	3	669,300	****	****	****	****	****	****					
16	2	3	1	897,640	****	****	****	****	****	****	****				
17	2	3	2	1027,780	****	****	****	****	****	****	****	****			
13	2	2	1	1317,420	****	****	****	****	****	****	****	****	****		
14	2	2	2	1325,600	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	

Figura 21. A) Resultados del análisis de varianza de tres vías (ANOVA) aplicado a carotenoides (µg/L cultivo) de los cultivos de *H. akashiwo*. **B)** Resultados del análisis de post hoc de Student-Newman-Keuls para carotenoides (µg/L cultivo). La tabla muestra la comparación múltiple entre los distintos tratamientos, considerando las combinaciones de cepa, fuente de nitrógeno y salinidad. Las diferencias significativas entre medias se indican mediante agrupaciones con letras distintas (p < 0,05).

A

B

Univariate Tests of Significance for Clorofila a (pg/célula)						Newman-Keuls test; variable Clorofila a (pg/célula)												
Sigma-restricted parameterization						Homogenous Groups, alpha = .05000 (Non-Exhaustive Search)												
Effective hypothesis decomposition						Error: Between MS = .67621, df = 54.000												
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p	Cell No.	Cepa	Fuente N	Salinidad	Clorofila a (pg/célula) Mean	a	b	c	d	e	f	g	
Intercept	3914,386	1	3914,386	5788,700	0,000000	9	1	3	3	2,21406	****							
Cepa	247,411	1	247,411	365,877	0,000000	7	1	3	1	2,32964	****							
Fuente N	394,197	2	197,098	291,474	0,000000	6	1	2	3	3,02333	****	****						
Salinidad	97,339	2	48,670	71,974	0,000000	8	1	3	2	3,22841	****	****						
Cepa*Fuente N	62,454	2	31,227	46,179	0,000000	5	1	2	2	4,25028	****	****	****					
Cepa*Salinidad	0,158	2	0,079	0,117	0,889875	4	1	2	1	4,76151			****					
Fuente N*Salinidad	124,887	4	31,222	46,172	0,000000	16	2	3	1	6,87062				****				
Cepa*Fuente N*Salinidad	14,467	4	3,617	5,349	0,001057	17	2	3	2	7,21301					****			
Error	36,515	54	0,676			12	2	1	3	7,26130						****		
						18	2	3	3	7,52963							****	
						3	1	1	3	7,64479								****
						2	1	1	2	8,28655								****
						14	2	2	2	8,50778								****
						15	2	2	3	9,11282								****
						13	2	2	1	10,60359								****
						11	2	1	2	10,88394								****
						1	1	1	1	13,93826								****
						10	2	1	1	15,06100								****

Figura 22. A) Resultados del análisis de varianza de tres vías (ANOVA) aplicado a clorofila α (pg/célula) de los cultivos de *H. akashiwo*. **A)** Resultados del análisis de post hoc de Student-Newman-Keuls para clorofila a (pg/célula). La tabla muestra la comparación múltiple entre los distintos tratamientos, considerando las combinaciones de cepa, fuente de nitrógeno y salinidad. Las diferencias significativas entre medias se indican mediante agrupaciones con letras distintas (p < 0,05).

A

Univariate Tests of Significance for Clorofila c1+c2 (pg/célula)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	84,20114	1	84,20114	592,4288	0,000000
Cepa	3,77158	1	3,77158	26,5364	0,000004
Fuente N	13,27561	2	6,63780	46,7028	0,000000
Salinidad	11,15747	2	5,57873	39,2513	0,000000
Cepa*Fuente N	1,85672	2	0,92836	6,5318	0,002881
Cepa*Salinidad	4,18952	2	2,09476	14,7385	0,000008
Fuente N*Salinidad	13,70256	4	3,42564	24,1024	0,000000
Cepa*Fuente N*Salinidad	7,46741	4	1,86685	13,1349	0,000000
Error	7,67495	54	0,14213		

B

Newman-Keuls test; variable Clorofila c1+c2 (pg/célula)										
Homogenous Groups, alpha = .05000 (Non-Exhaustive Search)										
Error: Between MS = .14213, df = 54.000										
Cell No.	Cepa	Fuente N	Salinidad	Clorofila c1+c2 (pg/célula) Mean	a	b	c	d	e	
5	1	2	2	0,227131	****					
12	2	1	3	0,247172	****					
9	1	3	3	0,306242	****					
7	1	3	1	0,453464	****					
8	1	3	2	0,482475	****					
6	1	2	3	0,567904	****	****				
4	1	2	1	0,618074	****	****				
18	2	3	3	0,847908	****	****				
11	2	1	2	0,864643	****	****				
2	1	1	2	0,907890	****	****				
14	2	2	2	0,955329	****	****				
17	2	3	2	0,982446	****	****				
16	2	3	1	1,142348	****	****				
15	2	2	3	1,381815	****	****	****			
13	2	2	1	1,409339	****	****	****			
3	1	1	3	1,900439				****	****	
1	1	1	1	2,209263						****
10	2	1	1	3,961603						****

Figura 23. A) Resultados del análisis de varianza de tres vías (ANOVA) aplicado a clorofilas c1+c2 (pg/célula) de los cultivos de *H. akashiwo*. **B)** Resultados del análisis de post hoc de Student-Newman-Keuls para clorofilas c1+c2 (pg/célula). La tabla muestra la comparación múltiple entre los distintos tratamientos, considerando las combinaciones de cepa, fuente de nitrógeno y salinidad. Las diferencias significativas entre medias se indican mediante agrupaciones con letras distintas (p < 0,05).

A

B

Univariate Tests of Significance for Carotenoides (pg/célula)						Newman-Keuls test; variable Carotenoides (pg/célula)											
Sigma-restricted parameterization						Homogenous Groups, alpha = ,05000 (Non-Exhaustive Search)											
Effective hypothesis decomposition						Error: Between MS = ,28218, df = 54,000											
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p	Cell No.	Cepa	Fuente N	Salinidad	Carotenoides (pg/célula) Mean	a	b	c	d	e	f	g
Intercept	1558,405	1	1558,405	5522,773	0,000000	9	1	3	3	1,32476	****						
Cepa	111,372	1	111,372	394,688	0,000000	7	1	3	1	1,66012	****	****					
Fuente N	157,301	2	78,650	278,726	0,000000	6	1	2	3	2,02679	****	****	****				
Salinidad	39,746	2	19,873	70,427	0,000000	8	1	3	2	2,20618	****	****	****				
Cepa*Fuente N	15,865	2	7,933	28,112	0,000000	5	1	2	2	2,46041	****	****	****				
Cepa*Salinidad	0,975	2	0,488	1,728	0,187338	4	1	2	1	2,73812			****				
Fuente N*Salinidad	55,554	4	13,889	49,219	0,000000	16	2	3	1	4,39582				****			
Cepa*Fuente N*Salinidad	5,615	4	1,404	4,975	0,001733	17	2	3	2	4,48060					****		
Error	15,238	54	0,282			3	1	1	3	4,75237						****	
						12	2	1	3	4,92416							****
						2	1	1	2	5,03149							****
						18	2	3	3	5,09641							****
						14	2	2	2	5,22160							****
						15	2	2	3	5,53998							****
						13	2	2	1	6,52107							****
						11	2	1	2	6,60586							****
						1	1	1	1	8,47757							****
						10	2	1	1	10,27926							****

Figura 24. A) Resultados del análisis de varianza de tres vías (ANOVA) aplicado carotenoides (pg/célula) de los cultivos de *H. akashiwo*. **B)** Resultados del análisis de post hoc de Student-Newman-Keuls para carotenoides (pg/célula). La tabla muestra la comparación múltiple entre los distintos tratamientos, considerando las combinaciones de cepa, fuente de nitrógeno y salinidad. Las diferencias significativas entre medias se indican mediante agrupaciones con letras distintas ($p < 0,05$).

Parámetros fotobiológicos

A

Univariate Tests of Significance for FV/FM (Fv-Fm)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	8,956206	1	8,956206	1277,330	0,000000
Cepa	0,060930	1	0,060930	8,690	0,005588
Fuente N	0,057295	2	0,028648	4,086	0,025171
Salinidad	1,388045	2	0,694023	98,981	0,000000
Cepa*Fuente N	0,108330	2	0,054165	7,725	0,001616
Cepa*Salinidad	0,074982	2	0,037491	5,347	0,009263
Fuente N*Salinidad	0,049444	4	0,012361	1,763	0,157777
Cepa*Fuente N*Salinidad	0,028570	4	0,007142	1,019	0,410783
Error	0,252420	36	0,007012		

B

Newman-Keuls test; variable FV/FM (Fv-Fm)										
Homogenous Groups, alpha = ,05000 (Non-Exhaustive Search)										
Error: Between MS = ,00701, df = 36,000										
Cell No.	Cepa	Fuente N	Salinidad	FV/FM Mean	a	b	c	d	e	
9	1	3	3	0,194672	****					
17	2	3	2	0,194913	****					
5	1	2	2	0,196087	****					
11	2	1	2	0,208120	****					
8	1	3	2	0,213064	****					
6	1	2	3	0,248623	****					
2	1	1	2	0,258608	****					
3	1	1	3	0,368368	****	****				
14	2	2	2	0,382490	****	****				
18	2	3	3	0,385193	****	****				
15	2	2	3	0,460871	****	****				
12	2	1	3	0,473073	****	****				
10	2	1	1	0,497791	****	****	****			
7	1	3	1	0,581296	****	****	****	****		
16	2	3	1	0,615829	****	****	****	****		
4	1	2	1	0,620006	****	****	****	****		
1	1	1	1	0,682246	****	****	****	****		
13	2	2	1	0,749320	****	****	****	****	****	

Figura 25. A) Resultados del análisis de varianza de tres vías (ANOVA) aplicado a la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (FV/Fm) de los cultivos de *H. akashiwo*. **B)** Resultados del análisis de post hoc de Student-Newman-Keuls para la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (FV/Fm). La tabla muestra la comparación múltiple entre los distintos tratamientos, considerando las combinaciones de cepa, fuente de nitrógeno y salinidad. Las diferencias significativas entre medias se indican mediante agrupaciones con letras distintas ($p < 0,05$).

A

Effect	Univariate Tests of Significance for NPQmax (NPQmax) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	145,1170	1	145,1170	102,3825	0,000000
Cepa	9,1586	1	9,1586	6,4615	0,015471
Fuente N	21,2121	2	10,6061	7,4828	0,001916
Salinidad	62,9781	2	31,4891	22,2160	0,000001
Cepa*Fuente N	2,6639	2	1,3320	0,9397	0,400112
Cepa*Salinidad	3,9059	2	1,9529	1,3778	0,265104
Fuente N*Salinidad	53,0455	4	13,2614	9,3561	0,000027
Cepa*Fuente N*Salinidad	1,6813	4	0,4203	0,2965	0,878269
Error	51,0264	36	1,4174		

B

Cell No.	Newman-Keuls test; variable NPQmax (NPQmax) Homogenous Groups, alpha = ,05000 (Non-Exhaustive Search) Error: Between MS = 1,4174, df = 36,000			NPQmax Mean	a	b	c
	Cepa	Fuente N	Salinidad				
11	2	1	2	0,066667	****		
13	2	2	1	0,116667	****		
14	2	2	2	0,200000	****		
16	2	3	1	0,333333	****		
8	1	3	2	0,600000	****		
2	1	1	2	0,666667	****		
17	2	3	2	0,700000	****		
9	1	3	3	0,732922	****		
18	2	3	3	0,820625	****		
10	2	1	1	0,900000	****		
4	1	2	1	1,066667	****		
5	1	2	2	1,133333	****		
7	1	3	1	1,433333	****		
12	2	1	3	2,721369	****	****	
3	1	1	3	3,589183	****	****	****
1	1	1	1	3,600000	****	****	****
15	2	2	3	5,188712	****	****	****
6	1	2	3	5,638185		****	****

Figura 26. A) Resultados del análisis de varianza de tres vías (ANOVA) aplicado a la extinción no fotoquímica máxima de la fluorescencia de la clorofila (NPQmax) de los cultivos de *H. akashiwo*. **B)** Resultados del análisis de post hoc de Student-Newman-Keuls para la extinción no fotoquímica máxima de la fluorescencia de la clorofila (NPQmax). La tabla muestra la comparación múltiple entre los distintos tratamientos, considerando las combinaciones de cepa, fuente de nitrógeno y salinidad. Las diferencias significativas entre medias se indican mediante agrupaciones con letras distintas ($p < 0,05$).