

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



**INTERACCIONES ALELÓPATICAS ENTRE LAS MICROALGAS TÓXICAS**

*Karenia selliformis y Heterosigma akashiwo*

VICTORIA PAZ ALFARO AHUMADA

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

CONCEPCIÓN - CHILE

MAYO, 2022



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



## INTERACCIONES ALELÓPATICAS ENTRE LAS MICROALGAS TÓXICAS

*Karenia selliformis Y Heterosigma akashiwo*

Por

VICTORIA PAZ ALFARO AHUMADA

Profesor guía

Allisson Astuya Villalón

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

CONCEPCIÓN - CHILE

MAYO, 2022

**Universidad de Concepción**  
**Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas**

Este Seminario de Título ha sido realizado en el Laboratorio de Biotoxinas UdeC, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.

Profesor Guía:

Dra. Allisson Astuya Villalón  
Departamento de Oceanografía  
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Universidad de Concepción, Concepción

Comisión Evaluadora:

Dra. Alejandra Aguilera Belmonte  
Directora Bachillerato  
Universidad San Sebastián  
Puerto Montt

Dr. Juan José Gallardo Rodríguez  
Universidad de Almería  
España

Coordinador Seminario de Título:

Dr. Fernando Cruzat Cruzat  
Departamento de Oceanografía  
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Curva de crecimiento de la cepa chilena <i>Karenia selliformis</i> .....                                                                                                               | 19 |
| <b>Figura 2.</b> Curva de crecimiento de la cepa chilena <i>Heterosigma akashiwo</i> .....                                                                                                              | 19 |
| <b>Figura 3.</b> Curva de crecimiento de la diatomea <i>Phaeodactylum tricornutum</i> .....                                                                                                             | 20 |
| <b>Figura 4.</b> Curva de crecimiento de la diatomea <i>Thalassiosira pseudonana</i> .....                                                                                                              | 20 |
| <b>Figura 5.</b> Curva de crecimiento de la criptofita <i>Rhodomonas salina</i> .....                                                                                                                   | 21 |
| <b>Figura 6.</b> Densidad celular de <i>Thalassiosira pseudonana</i> después de 24 horas de exposición a sobrenadantes de <i>Karenia selliformis</i> y <i>Heterosigma akashiwo</i> .....                | 22 |
| <b>Figura 7.</b> Densidad celular de <i>Thalassiosira pseudonana</i> después de 48 horas de exposición a sobrenadantes de <i>Karenia selliformis</i> y <i>Heterosigma akashiwo</i> .....                | 23 |
| <b>Figura 8.</b> Eficiencia fotosintética máxima de <i>Thalassiosira pseudonana</i> después de 24 horas de exposición a sobrenadantes de <i>Karenia selliformis</i> y <i>Heterosigma akashiwo</i> ..... | 23 |
| <b>Figura 9.</b> Curvas de crecimiento de <i>Heterosigma akashiwo</i> y <i>Karenia selliformis</i> en cocultivos con contacto celular.....                                                              | 24 |
| <b>Figura 10.</b> Microfotografías de <i>Heterosigma akashiwo</i> y <i>Karenia selliformis</i> obtenidas desde cocultivos con contacto celular.....                                                     | 25 |
| <b>Figura 11.</b> Densidad celular de <i>Thalassiosira pseudonana</i> después de 24 horas de exposición a sobrenadantes del cocultivo y de <i>Rhodomonas salina</i> .....                               | 26 |

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi profesora guía la Dra. Allisson Astuya Villalon por su confianza y apoyo brindado en este trabajo de investigación financiado por el proyecto FONDECYT 1200845 “Role of allelochemical compounds in the ichthyotoxicity of bloom-forming microalgae” llevado a cabo en el Laboratorio de Biotoxinas de la Universidad de Concepción (LBTx-UdeC). Al centro de investigación COPAS Coastal ANID FB210021A por el financiamiento y la infraestructura para el desarrollo de mi investigación.

## RESUMEN

El dinoflagelado *Karenia selliformis* y la Raphidophyceae *Heterosigma akashiwo* son especies formadoras de floraciones algales nocivas (FAN), de especial interés debido a que son responsables de causar grandes pérdidas económicas a la industria acuícola alrededor del mundo. Una de las problemáticas centrales en torno a las floraciones de este tipo, es la ausencia del conocimiento sobre los mecanismos asociados a la toxicidad, donde se presume que los peces no son el objetivo sino más bien una víctima de la competencia entre especies de microalgas por los recursos, sucesión y formación de FAN. Por lo tanto, el objetivo principal de esta investigación fue evaluar el potencial tóxico de los compuestos solubles con origen alelopático producidos por *K. selliformis* y *H. akashiwo* a través de la evaluación de la respuesta tóxica en ensayos de co-cultivo y en bioensayos de microalgas. Los resultados demuestran que existe una competencia evidente entre estas especies por predominar el medio, debido a que la densidad celular de *H. akashiwo* disminuye con el tiempo mientras que *K. selliformis* crece de forma exponencial. Por otro lado, mediante microscopía se observa lisis en las células de *H. akashiwo* mientras que las células de *K. selliformis* se mostraban sanas y con movilidad normal (similar al control) en la muestra. Luego se utilizó el exudado libre de células de la competencia entre estas especies para evaluar la respuesta tóxica del bioensayo *Thalassiosira pseudonana*. Esto generó una disrupción del metabolismo a través de la inhibición del fotosistema II (Fv/Fm) lo que desencadenó una supresión en el crecimiento de *T. pseudonana*. Finalmente, se evidenció el efecto alelopático de la microalga tóxica *Karenia selliformis* sobre *Heterosigma akashiwo* en co-cultivos con contacto celular. Sin embargo, el sobrenadante libre de células del co-cultivo presentó un efecto tóxico menor que el sobrenadante libre de células de *K. selliformis*, lo que sugiere que *K. selliformis* ejerce un efecto alelopático no potenciado por competencia.

## INTRODUCCIÓN

### Floraciones algales nocivas

Las microalgas son organismos microscópicos fotosintéticos con especial relevancia para el resto de las especies marinas al constituir el nivel trófico primario en los ecosistemas acuáticos, convirtiéndolas en las primeras productoras de materia orgánica. Algunas microalgas tienen la capacidad de “florecer”, esto significa que bajo ciertas condiciones ambientales pueden reproducirse y aumentar rápidamente su número en un lugar determinado. Estos fenómenos son denominados “floraciones algales” y son parte natural del ciclo estacional de los organismos fotosintéticos en los ecosistemas marinos, siendo componentes clave en la estructura y dinámica de los océanos (Berdalet et al., 2016). Entonces, se denominan Floraciones Algales Nocivas (FAN) a la aparición de cualquier población microalgal, ya sea planctónica o bentónica, que conlleve un efecto nocivo para las poblaciones naturales de organismos marinos, la acuicultura, las zonas turísticas costeras o la salud humana (Díaz et al., 2019; Sar & Ferrario, n.d.).

Las FANs pueden causar cierres de operaciones comerciales de pesca y acuicultura que provocan pérdidas económicas millonarias (Díaz et al., 2019; Montes et al., 2018) los efectos nocivos más graves se producen cuando algunas microalgas producen metabolitos secundarios que pueden ser tóxicos y que muestran una potente actividad biológica contra una amplia variedad de organismos marinos o en humanos tras el consumo de mariscos contaminados (Hallegraeff, 2010; Mardones et al., 2019). Se sugiere la hipótesis de que el propósito ecológico principal de la producción de estos metabolitos secundarios es la sobrevivencia y competencia frente a otras especies, logrando por ejemplo inhibir el crecimiento de otras especies de fitoplancton competidoras y disminuir las pérdidas al matar a sus herbívoros (disuasión del pastoreo) (Granéli et al., 2008).

Las especies nocivas son una pequeña parte de la biodiversidad total del fitoplancton y es poco el conocimiento que se tiene sobre la frecuencia de aparición de estos eventos (Davidson et al., 2021), existen diferentes tipos de FAN y son caracterizados por sus consecuencias.

1. En primer lugar existen los producidos por especies que no producen compuestos tóxicos, pero que pueden alcanzar grandes densidades que logran agotar los nutrientes y el oxígeno, la disminución del oxígeno genera condiciones anóxicas y desencadenan la muerte de diversas especies presentes en la columna de agua (Vargas et al., 2016), por otro lado, altas densidades pueden generar un cambio de color del agua (por ejemplo, rojo, pardo, café, verde) con sus pigmentos (Salgado 2011) lo que afecta el turismo y las actividades recreativas en el mar.
2. Los eventos de especies que matan peces, llamadas microalgas ictiotóxicas debido a que pueden dañar seriamente sus branquias, ya sea mecánicamente como las diatomeas con sus largas espinas o mediante la producción de sustancias que producen lesiones branquiales que resultan en la muerte del pez (Ling & Trick, 2010).
3. Por ultimo los eventos protagonizados por especies tóxicas que, aunque no producen altas concentraciones celulares, ni cambian el color del agua, sí contaminan los mariscos con biotoxinas que logran encontrar su camino en la cadena alimentaria y llegar hasta el consumo humano (Anderson et al., 2012), causando efectos adversos asociados a tres biotoxinas

denominadas por sus efectos Veneno Amnésico de los Mariscos (VAM) (Alexander et al., 2009), Veneno Diarreico de los Mariscos (VDM) (Villarroel G, 2004) y el Veneno Paralizante de Mariscos (VPM) (Pizarro et al., 2015).

Estas últimas, producen biotoxinas tan potentes, que pueden resultar dañinas, aunque no alcancen concentraciones celulares elevadas, bastan unos pocos cientos (o miles, según la especie) de células por litro para que los mariscos adquieran niveles de biotoxinas que sobrepasan los límites legales establecidos como nivel de regulación, obligando a las autoridades competentes a prohibir su recolección y comercialización (Suárez & Guzmán, 2005). Los mariscos tóxicos pueden transmitir estas sustancias a niveles superiores de la cadena trófica, actuando como vectores que dan lugar a los síndromes de “intoxicación por mariscos” que afectan a los vertebrados y al humano constituyendo un peligro para la salud pública (Martín et al., 1996).

Se ha reportado por diversos investigadores un aparente incremento global de los eventos de floraciones nocivas en número, extensión geográfica, frecuencia, diversidad de especies, intensidad y daño (Granéli et al., 2008; Hennon & Dyhrman, 2020; Moore et al., 2015; Trainer et al., 2020). Si a esto unimos el incremento en la demanda de los productos del mar como moluscos filtradores y salmónidos que se ha producido en las últimas décadas, las FAN tienen un importante efecto económico y social y un real impacto a nivel para la salud mundial (Berdalet et al., 2016). Este rápido incremento en las floraciones de algas nocivas pueden ser respuestas ante condiciones climáticas cambiantes (Hallegraeff, 2010) incluido el calentamiento global, la intensidad de la estratificación, las entradas de agua dulce y los patrones naturales de variabilidad climática, como la Oscilación del Sur de El Niño y la Oscilación Decadal del Pacífico (Trainer et al., 2020), por su parte, no se puede dejar de mencionar el impacto de las modificaciones en el medio marino, como la liberación de agua de lastre, la acuicultura intensiva y el aporte excesivo de nutrientes, que pueden haber contribuido a estos cambios (Díaz et al., 2019)

Los eventos de FAN ha tomado mayor interés en las últimas décadas debido al impacto negativo que ejercen sobre la acuicultura por el riesgo de consumo de mariscos contaminados, las mortalidades masivas tanto de organismos silvestre como de cultivo, lo que conlleva a evidentes efectos económicos y sociales (Townhill et al., 2018), aun cuando las especies de microalgas ictiotóxicas son responsables de impactos económicos globales mucho mayores que las especies que contaminan los mariscos, estas han acaparado la atención de los investigadores y el conocimiento de las especies ictiotóxicas se ha visto limitado, por lo tanto **se debe hacer un esfuerzo en comprender la ecología de este grupo y los mecanismo de acción que conducen la producción de sustancias nocivas para los peces.**

### **Efectos de las Floraciones Algales Nocivas en la piscicultura chilena**

La proliferación del grupo de microalgas que matan peces ha tenido un creciente interés debido a sus impactos en el cultivo intensivo de peces, estos eventos han generado pérdidas económicas de miles de millones dólares en la industria piscicultora y Chile que ha llegado a ser el segundo productor mundial de salmónidos (Buschmann, 2005) no ha estado exento a estos daños. Se han reportado muertes de peces por FAN en el sur de Chile desde el desarrollo del cultivo intensivo del salmón en 1982 (Mardones, 2020). Entre las especies que han afectado a la salmonicultura chilena destacan los dinoflagelados *Alexandrium catenella*, *Karenia spp.* y *Karlodinium cf australe*, la diatomea *Chaetoceros convolutus*, la raphidophyceae *Heterosigma akashiwo* y el fitoflagelado *Pseudochattonella cf. verruculosa* (Sandoval

et al., 2017). Las primeras FAN que provocaron muerte de peces estuvieron relacionadas con la ocurrencia de flagelados, en 1988 una floración ( $100.000 \text{ células} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) de *Heterosigma akashiwo* desencadenó la mortalidad de 5000 toneladas de salmón evaluado en USD\$11M (Clemente y Lembeje, 1993) en el seno de Reloncaví. Luego, en el verano del 2000 la misma especie volvió a florecer y provocó la mortalidad del 40% del salmón de cultivo en el fiordo Reñihue, sólo bastó una densidad de  $40 \text{ células} \cdot \text{ml}^{-1}$  de *H. akashiwo* junto con una alta concentración de *Leptocylindrus danicus* para producir la muerte masiva de salmones en un solo centro de cultivo, lo que apunta al alto potencial de ictiotoxicidad de este flagelado en una acción sinérgica con la diatomea (Mardones 2012). Estos eventos no cesaron, y el año 2016 ocurrió el evento más dañino y extremo en la historia de la industria del salmón que involucró a otras dos microalgas ictiotóxicas *Pseudochattonella verruculosa* y *Alexandrium catenella* afectando a 45 centros de cultivo en la zona del seno de Reloncaví (Clément et al. 2016)(León-Munõz et al., 2018), este evento desencadenó pérdidas económicas cercanas a USD\$ 800M y grandes problemas sociales y ambientales (Díaz et al., 2019). En el verano austral de 2018, una floración masiva de Kareniaceae (de cientos de kilómetros de ancho) mató a millones de animales marinos pelágicos y bentónicos en Quellón, Chiloé, y se asoció la mortalidad de 1600 toneladas de salmón al dinoflagelado *Karenia selliformis* (Mardones et al., 2020). Recientemente se reportó una FAN entre el mes de marzo y abril de este año protagonizada por *H. akashiwo*, alcanzó una densidad de  $200.000 \text{ células} \cdot \text{ml}^{-1}$  generando una mortalidad de 7.000t de salmónidos en el fiordo Comau, además se detectaron algunos ejemplares de *Karenia sp.* la cual nunca se había observado en este fiordo (Salmonexpert, 2021).

Los eventos mencionados son sólo algunos de los que han ocurrido en el sur de Chile y a pesar de los impactos que han generado, es poco el avance en nuestra comprensión de cómo estos eventos desencadenan mortalidades masivas de peces, considerando que son una gran amenaza para el desarrollo de la salmonicultura en Chile, a pesar del esfuerzo realizado por los programas de monitoreo, la información sobre las especies ictiotóxicas que se encuentran en los fiordos chilenos es escasa y no se han estudiado en cuanto a su potencial nocivo. Por lo tanto, los programas de monitoreo chilenos alertan a los piscicultores sobre la presencia de una especie ictiotóxicas solo en base a los efectos nocivos reportadas en otras áreas costeras (Mardones et al., 2020). Además, es importante mencionar que el evento del 2016 a pesar de ser extremo en intensidad e impactos socioeconómicos, no es un evento aislado en el sur y Patagonia chilena donde se concentra la industria salmonicultura.

### **Microalgas ictiotóxicas y su potencial para matar peces**

Las especies de floración de algas nocivas que afectan negativamente a los peces y son capaces de causar sus muertes masivas se conocen como microalgas ictiotóxicas. Este grupo de algas es diverso y está compuesto por especies de varios grupos que incluyen diatomeas, dinoflagelados, prymnesiofitas, raphidofitas y dictyochophytes (Rensel y Whyte, 2003). Algunas de estas especies son productores de ficotoxinas, especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) que generan reacciones toxigénicas en los peces (Dorantes-Aranda et al., 2015), ocasionando lesiones en el tejido branquial como levantamiento epitelial, necrosis celular y alteración de las células de cloruro, que produce una secreción masiva de moco de las branquias y respuestas fisiológicas como la hipoxia y posteriormente asfixia.

El daño a los peces también puede ser causado por una combinación de estos efectos. Por ejemplo, algunas especies de algas toxigénicas, como *Prymnesium parvum*, pueden inducir la producción de moco

en las branquias de los peces, provocando efectos similares a los de daño físico o irritación (Fistarol & Legrand, 2003). Dentro de los dinoflagelados, el género *Karlodinium spp.* ha causado grandes mortalidades de peces en las costas del mundo, este género es interesante ya que se han descrito las ictiotoxinas responsables karlotoxinas 1 y 2 (KmTx 1 y 2) (Peng et al., 2010; Van Wagoner et al., 2008) las que afectan única y directamente a las branquias de los peces (Deeds et al., 2006).

En este mismo contexto, el género *Karenia* ha generado interés debido a que la mayoría produce toxinas (brevetoxinas, gimnodiminas e ictiotoxinas indefinidas) y metabolitos secundarios como ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), una variedad de esteroides tóxicos y especies reactivas de oxígeno (ROS) que llegan a matar a los peces y otros organismos marinos (Brand et al., 2012). Entre las especies de *Karenia*, *K. selliformis* ha sido identificada como productora de gimnodimina-A, GYM-B y GYM-C (Brand et al., 2012), que genera la muerte de invertebrados y vertebrados marinos, además existe evidencia de que *K. selliformis* puede producir una molecular similar a la brevetoxina (Brand et al., 2012). En *Heterosigma akashiwo* también se ha identificado una neurotoxina orgánica similar a la brevetoxina (Khan et al., 2008), además de la producción de dos especies reactivas de oxígeno, superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Marshall et al., 2005) y compuestos hemolíticos, que lisan los glóbulos rojos. Sin embargo, ninguno de estos supuestos compuestos tóxicos se han relacionado de forma independiente con la ictiotoxicidad de *H. akashiwo* (Powers et al., 2012) y sucede lo mismo con otras especies ictiotóxicas.

Las posibles funciones de ROS y PUFA en la muerte de peces son muy discutidas, entre los PUFA, el EPA ha demostrado ser tóxico para el pez damisela (*Acanthochromis polyacanthus*) (Marshall et al., 2003). Sin embargo, investigaciones han demostrado que las células vivas no liberan PUFA al medio extracelular y, por lo tanto, no se puede atribuir directamente la muerte de los peces a estos compuestos (Pezzolesi et al., 2010). Por otro lado el papel de las ROS en la ictiotoxicidad ha sido sugerido durante mucho tiempo como uno de los factores que desencadena daños en las branquias de los peces y conlleva a la mortalidad de estos (Mardones et al., 2015).

Las ROS son oxidantes y se consideran citotóxicos a través del daño del ADN y la peroxidación de lípidos debido a su capacidad para descomponerse en el ion hidroxilo altamente reactivo ( $OH^{\cdot}$ ). La toxicidad de ROS para una amplia gama de sistemas biológicos está bien documentada, incluida la reducción de la viabilidad de las células (Marshall et al., 2005). Los radicales superóxido e hidroxilo afectan el ADN, las proteínas y los lípidos, en las proteínas, la oxidación de las cadenas laterales de aminoácidos puede provocar cambios conformacionales y la pérdida de actividad asociada (Godrant et al., 2009). Sin embargo, el conocimiento actual es que los efectos observados son atribuibles a una relación sinérgica entre ROS, PUFA y biotoxinas (Marshall et al., 2003), y que depende de cada especie las causas de la ictiotoxicidad. Los mecanismos causales que conducen a la muerte de peces siguen siendo inciertos puesto que no todas las microalgas ictiotóxicas producen estos compuestos en cantidades que puedan explicar su impacto en los peces y los resultados no son concluyentes para la mayoría de los grupos de algas (Powers et al., 2012).

El progreso en el estudio e identificación de los compuestos responsables de la mortalidad masiva de peces se ha visto obstaculizado por diferentes factores, como la diversidad de taxones que generan estos daños, el uso de diferentes sistemas de bioensayo y la falta de métodos analíticos para cuantificar y caracterizar las “ictiotóxicas” (Hallegraeff et al. 2017). Los experimentos en laboratorio han incluido ensayos de *Artemia* o *Daphnia*, eritrocitos de peces o mamíferos, y una amplia gama de peces jóvenes o

adultos (damisela, pez carnero, pececillo de montaña, pez cebra, salmón, lubina) probados en diferentes tiempos de exposición (Mohamed & Al-Shehri, 2012). La corta vida útil y lo frágil de los compuestos ictiotóxicos, además de otros factores, como el comportamiento diferencial de los compuestos ictiotóxicos en envases de plástico o vidrio, o entre condiciones de luz y oscuridad pueden ser un problema al obtener resultados con interferencias no consideradas (Dorantes-Aranda et al., 2013).

### **Procesos alelopáticos que desencadenan la producción de compuestos tóxicos**

Se ha sugerido como hipótesis que el propósito ecológico principal de la producción de estos compuestos activos secundarios “tóxicos”, tales como las denominadas ictiotóxicas, ROS y PUFAS, es la “competencia” frente a otras especies, logrando por ejemplo inhibir el crecimiento de otras especies de fitoplancton competidoras (alelopatía) y disminuir las pérdidas al matar a sus herbívoros (disuasión del pastoreo) (Granéli et al., 2008). Dentro de la ecología del fitoplancton sigue siendo una interrogante el por qué algunas especies logran formar floraciones y otras no, en general, las especies que pueden competir eficazmente por los nutrientes logran dominar la comunidad de fitoplancton. Sin embargo, las floraciones de algas nocivas a menudo están formadas por dinoflagelados, que se consideran competidores inferiores en comparación con las diatomeas debido a su menor crecimiento y absorción de nutrientes (Hakanen et al., 2014). Para superar la desventaja competitiva, como se mencionó anteriormente las especies a menudo poseen mecanismos compensatorios como la liberación de metabolitos secundarios que afectan negativamente el crecimiento de otros organismos; es decir, son compuestos “alelopáticos”. La definición de alelopatía se propuso como “interacciones bioquímicas directas o indirectas entre plantas, y potencialmente también microorganismos, mediadas a través de la liberación de aleloquímicos por parte de las plantas algas, bacterias y hongos” (Latif et al., 2017). En el proceso alelopático, las sustancias funcionales se denominan aleloquímicos, un grupo específico de metabolitos secundarios que muestran una evidente supresión en la germinación, crecimiento, supervivencia y reproducción de plantas y microorganismos vecinos (Wu et al., 2021).

Con evidencia creciente, las interacciones alelopáticas específicas de las especies se consideran un factor importante en la competencia del fitoplancton por los recursos, la sucesión y la formación de FAN (Band-Schmidt et al., 2020; Fistarol et al., 2004; Long et al., 2018; Wang et al., 2020). Los efectos comunes inducidos aleloquímicamente incluyen la inhibición del crecimiento y la fotosíntesis, así como la muerte de las células objetivo (Granéli & Hansen 2006). Sin embargo, los procesos que desencadenan la alelopatía y causan los efectos subletales observados todavía son poco conocidos (Hakanen et al., 2014). Los experimentos de laboratorio han demostrado el efecto de la alelopatía entre las especies de microalgas y sugiere que los metabolitos secundarios se exudan al medio de cultivo actuando como compuestos alelopáticos. Por ejemplo, los raphidofitos *Heterosigma akashiwo* y *Chattonella antiqua* liberan metabolitos durante la fase exponencial que inhiben el crecimiento de la diatomea *Skeletonema costatum* (Matsuyama et al., 2000).

Algo similar ocurren en las interacciones de crecimiento entre *Heterosigma akashiwo* y *Skeletonema costatum*, en estudios controlados usando cultivos bi-algales, los hallazgos indicaron que el crecimiento de cualquiera de las especies podría ser suprimido por los aleloquímicos no identificados del otro, dependiendo de las densidades celulares, dando como resultado una guerra química por espacio y nutrientes (Park et al., 2018; Yamasaki, Nagasoe, Matsubara, Shikata, et al., 2007). Las densidades celulares tanto del alga tóxica como de su objetivo parecen ser importantes para el resultado de la

interacción (Band-Schmidt et al., 2020). Sin embargo, a pesar de existir antecedentes que sugieren esta hipótesis, aún existen múltiples interrogantes que deben ser abordadas.

Smayda & Reynolds (2001) presentaron modelos de sucesión y ensamblajes de dinoflagelados planctónicos basados en adaptaciones que evolucionaron con el tiempo para sobrevivir a los cambios que ocurren en el ambiente. Adicionalmente y en este contexto, se ha determinado que *Prorocentrum donghaiense* forma floraciones de algas a gran escala y alcanza altas densidades de biomasa con una amplia distribución en el Mar de China Oriental. A menudo, asociados o relacionados a estas floraciones, se identifica presencia de *Karlodinium veneficum* la que puede convertirse en una floración densa mientras disminuye la densidad de *P. donghaiense*. Mientras que *P. donghaiense* no se asocia a toxicidad, la FAN de *K. veneficum* si es asociada con muertes masivas de peces las que pueden ser explicadas por su capacidad de producir toxinas hemolíticas, ictiotoxinas y otras sustancias citotóxicas durante las floraciones (Wang, Wu, et al., 2020). **¿Es la competencia generada por la floración de *P. donghaiense* lo que gatilla la toxicidad de *K. veneficum*?**

Jonsson y col. (2009) realizaron una revisión de la evidencia publicada de alelopatía y en qué condiciones se encontraron efectos, de acá se extrae que las altas densidades (abundancia) de microalgas favorece la alelopatía, lo que ayudaría al organismo a mantener la floración. Desde el análisis de las estrategias competitivas para la floración de dinoflagelados en el ecosistema, se han obtenido indicios de ciertos factores bióticos que pueden desencadenar floraciones nocivas en los ambientes marinos, esta información es relevante para lograr esclarecer en qué condiciones el dinoflagelado tóxico *K. selliformis* y la raphidofita *H. akashiwo* podría llegar a generar una FAN, y como los procesos alelopáticos juegan un rol importante en la proliferación y mantención del evento.

### **Desenredando las interacciones alelopáticas**

La interacción entre especies es importante para comprender la dinámica del fitoplancton, en tales casos, los efectos alelopáticos de un alga específica y muy dañina para la piscicultura chilena como *H. akashiwo* sobre otras microalgas han sido documentados y estudiados mediante experimentos de crecimiento mixto para evaluar si los compuestos alelopáticos son producidos como parte de la activación de mecanismos de defensa o sobrevivencia frente a otras especie (Mohamed & Al-Shehri, 2012; Qiu et al., 2012; Wang, Xue, et al., 2020).

Aun cuando existen estos reportes sobre *H. akashiwo* no existe información sobre las posibles interacciones bióticas entre *H. akashiwo* y *K. selliformis* y se desconoce si existe algún efecto alelopático entre ambas especies. Por lo tanto, identificando que la alelopatía promueve la sucesión y dominancia de algunas especies sobre otras cuando estas coexisten y en base a las características nocivas y la dominancia de *H. akashiwo* durante las floraciones se espera que tenga un efecto alelopático sobre el dinoflagelado *K. selliformis* bajo condiciones de cultivo controladas. Por consiguiente, para abordar esta pregunta se propone evaluar la competencia entre estas especies a través de la exposición a exudados libres de células, co-cultivos y cultivos sin contacto directo para obtener información sobre las posibles interacciones alelopáticas entre *H. akashiwo* y *K. selliformis*.

A través de este modelo experimental se busca aportar al conocimiento de los efectos como las ROS juegan un papel importante en la mantención de la floración y lograr a largo plazo identificar que

desencadena la liberación de metabolitos al medio con el fin de reconocer los genes que regulan esta producción de compuestos e identificar marcadores moleculares que puedan anticiparnos a una floración algal nociva y poder tomar decisiones oportunas evitando grandes pérdidas ecológicas y económicas.

## **HIPÓTESIS**

### **HIPÓTESIS GENERAL**

La co-existencia de las microalgas tóxicas *Heterosigma akashiwo* y *Karenia selliformis* induce un incremento en la liberación de compuestos solubles con potencial alelopático exudados al medio.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar que la co-existencia de *Heterosigma akashiwo* y *Karenia selliformis* induce un incremento en la liberación de compuestos solubles con potencial alelopático exudados al medio.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Demostrar bajo condiciones de cultivo que *K. selliformis* y *H. akashiwo* son capaces de exudar compuestos solubles con efectos alelopáticos sobre un modelo biológico *Thalassiosira pseudonana*.
2. Evaluar el incremento de los efectos alelopáticos inducidos por el co-cultivo de *H. akashiwo* y *K. selliformis* sobre modelo biológico *Thalassiosira pseudonana*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Cepas y condiciones de cultivo

Para llevar a cabo esta investigación se utilizaron 2 cepas de microalgas chilenas tóxicas *Heterosigma akashiwo* y *Karenia selliformis* provenientes de la Colección de Algas Nocivas del Centro de Estudios

de Algas Nocivas en Chile (CREAN/IFOP) y posteriormente mantenidas por el Laboratorio de Biotoxinas Marinas UdeC (LBTx-UdeC) bajo protocolos estándares de bioseguridad.

Los cultivos se realizaron en medio L1, preparado con agua de mar natural de la costa chilena filtrada (0,2  $\mu\text{m}$ ), se ajustó la salinidad a 32 psu y luego se autoclavó (Mardones et al., 2021). Posteriormente los cultivos se iniciaron a 1000 células $\cdot\text{mL}^{-1}$  a partir de un inoculo de cultivo madre en condiciones de crecimiento en fase exponencial, se mantuvieron en cámaras de cultivo a una temperatura de  $17^{\circ}\text{C} \pm 2$ , con una irradiancia  $140 \mu\text{mol}\cdot\text{fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fotoperiodo 16h:8h (Luz:Oscuridad) y sin aireación.

## 2. Cultivos fitoplancton para bioensayos

Inicialmente se propusieron 3 tipos de microalgas para el desarrollo de bioensayos alelopáticos, *Rhodomonas salina* (CCM-UDEC 153) obtenida de la colección de cultivo de microalgas de la Universidad de Concepción (FICOLAB), *Phaeodactylum tricornutum*, y *Thalassiosira pseudonana* (donadas por el Dr. Alvarez del departamento de Acuicultura; Universidad Católica del Norte). Las células *Thalassiosira pseudonana* y *Phaeodactylum tricornutum*, fueron recibidas a  $20^{\circ}\text{C}$  y fotoperíodo 12:12, mientras que *Rhodomonas salina* fue recibida a  $15^{\circ}\text{C}$  en medio Walne. Los inóculos fueron adaptados durante 7 días a las condiciones experimentales definidas para las microalgas tóxicas, correspondientes a un fotoperiodo 16:8, temperatura  $17^{\circ}\text{C}$  y medio L1 suplementado con sílice, una vez adaptadas, comprobado por la supervivencia del cultivo y su reproducción frente a las nuevas condiciones propuestas, se comenzó el escalamiento del cultivo para posteriormente obtener las curvas de crecimiento y definir la especie objetivo.

## 3. Curvas de crecimiento

### 3.1 Curvas de crecimiento de microalgas tóxicas

Para evaluar los posibles efectos alelopáticos en cada cepa mediante experimentos de exposición de co-cultivo fue necesario conocer los tiempos y fases de crecimiento de cada cepa. Las curvas de crecimiento de *H. akashiwo* y *K. selliformis* se iniciaron a 1000 cél/ml un volumen final de 150 mL de medio L1. Ambos inóculos son obtenidos de cultivos madre en fase exponencial.

La densidad celular se evaluará día por medio mediante recuento celular con microscopio óptico (10X) en cámaras Sedgewick Rafter de 1 ml, luego se calculó su densidad a través de la siguiente formula:

$$D(\text{cél/ml}) = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células contadas}}{\text{n}^{\circ} \text{ cuadraditos barridos}} \times \frac{1000}{1 \text{ ml}}$$

donde D= densidad celular (cél/mL)

### 3.2 Curvas de crecimiento de bioensayos

Para evaluar los efectos alelopáticos del sobrenadante libre de células de las microalgas tóxicas, previamente se tuvo que estandarizar los tiempos de crecimiento de los bioensayos *T. pseudonana*, *P. tricornutum* y *R. salina*. Las curvas de crecimiento se iniciaron con 20.000 cel/ml en un volumen final de 150 mL de medio L1 suplementado con sílice. Todos los inóculos fueron obtenidos desde cultivos madre en fase exponencial.

La densidad celular se evaluó diariamente mediante recuento celular con microscopio invertido (20X) en cámaras Neubauer, luego se calculó su densidad a través de la siguiente formula:

$$\text{Cel/mL} = \frac{\text{Conteo promedio por cuadrante} * 10^4 \text{ (factor de conversión)} * \text{factor de dilución}}{\text{n}^\circ \text{ de cuadrantes contados}}$$

#### 4. Tasas de crecimiento

Luego de realizar las curvas de crecimiento, se calcularán las tasas de crecimiento  $k$  (duplicación de biomasa día<sup>-1</sup>) según Guillard (1973), la que será estimada durante la fase de crecimiento exponencial, para cada una de las muestras, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$k = \frac{3,322}{t_2 - t_1} + \log \left( \frac{n_2}{n_1} \right)$$

Donde:

$k$ = Tasa máxima de crecimiento

$t_1$ = Tiempo inicial

$t_2$ = Tiempo final

$n_1$ = Concentración celular inicial

$n_2$ = Concentración celular final

#### Metodología objetivo 1

##### 5. Obtención de los exudados libres de células con potencial alelopático de *K. selliformis* y *H. akashiwo*

Para evaluar la producción de compuestos solubles con potencial alelopático de las especies, estas fueron cultivadas hasta la fase exponencial, luego los exudados que contienen los potenciales compuestos solubles alelopáticos fueron separados de las células utilizando un sistema de filtración al vacío con filtros de fibra de vidrio de 0.22 micras. Los filtrados fueron preparados frescos en tubos de vidrio aislados y utilizados a la brevedad para evitar cualquier pérdida de los compuestos en su almacenaje. Se determinó la densidad del cultivo de *H. akashiwo* y *K. selliformis* antes de la separación de los exudados, de esta forma se podrá obtener una relación de la concentración celular del cultivo y los efectos tóxicos que desencadenarán.

##### 6. Determinación del potencial tóxico de los exudados libres de células a de *K. selliformis* y *H. akashiwo* a través de la exposición al bioensayo *Thalassiosira pseudonana*.

Para determinar que la posible actividad alelopática de *H. akashiwo* y *K. selliformis* fue provocada por sustancias químicas solubles que se exudaron al medio, el bioensayo *Thalassiosira pseudonana* se expuso a sobrenadantes libres de células de cultivos en fase exponencial de *Heterosigma akashiwo* y *Karenia selliformis*. Los tratamientos fueron preparados en matraces Erlenmeyer de 100 mL por

duplicado, se utilizaron dos concentraciones distintas de sobrenadante, 33% V/V (10ml) y 66% V/V (20ml) y se completó un volumen final de 30ml con medio L1 y finalmente se agregaron los inoculos para obtener una concentración final de 20.000 cél/ml de *T. pseudonana*. Como control se cultivó el bioensayo en medio L1 suplementado con sílice. Para cada caso se tomó un volumen de muestra para registrar diariamente abundancia celular y posterior a 24 horas se registró eficiencia fotosintética y actividad enzimática superóxido dismutasa. Los cultivos fueron mantenidos a 17°C con fotoperiodo 16h:8h (L:O) y a 100  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de irradiancia.

## **7. Medición del rendimiento fotoquímico**

El rendimiento fotoquímico, una medida de la eficacia de la fotosíntesis, se midió utilizando un fluorómetro PAM AquaPen-C AP-C 100. Para cada tratamiento, las muestras de microalgas se adaptaron a la oscuridad durante 20 minutos antes de determinar los valores de  $F_v / F_m$

## **8. Medición de actividad de SOD**

Se utilizó un kit de detección de actividad de superóxido dismutasa total (SOD) (Cayman, USA) para determinar la actividad de SOD de *T. pseudonana* frente a los sobrenadantes libres de células siguiendo las instrucciones del fabricante.

## **Metodología objetivo 2**

## **9. Evaluación de contacto celular directo (Co-cultivos) de microalgas ictiotóxicas**

Los experimentos de contacto celular o co-cultivos fueron preparados en matraces Erlenmeyer de 250 mL, se adicionaron inóculos de un cultivo de *H. akashiwo* en fase exponencial para obtener 9000 cel/ml y un inóculo de cultivo de *K. selliformis* en fase exponencial para obtener 3000 cel/ml, luego se completó con medio L1 hasta alcanzar un volumen total de 150 mL. Como control se utilizaron monocultivos de *H. akashiwo* y *K. selliformis* a la misma concentración descrita, los cultivos fueron mantenidos a una temperatura de  $17^{\circ}\text{C} \pm 2$ , irradiancia  $140 \mu\text{mol} \cdot \text{fotón} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , fotoperiodo 16h:8h (Luz:Oscuridad) y sin aireación. Se tomaron volúmenes de muestra diariamente para realizar conteos celulares y tomar fotografías entre las especies desde que comienza el co-cultivo.

## **10. Determinación de la toxicidad del sobrenadante libre de células del co-cultivo entre *K. selliformis* y *H. akashiwo* frente al bioensayo *Thalassiosira pseudonana*.**

Se utilizó un bioensayo de microalgas para evidenciar la actividad alelopática basándose en la respuesta de la diatomea *Thalassiosira pseudonana* como especie objetivo. El bioensayo fue expuesto a concentraciones de 33% y 66% v/v de los extractos alelopáticos de los co-cultivos (actividad N° 8), los matraces fueron inoculados con cultivo de *Thalassiosira pseudonana* en fase de crecimiento exponencial para obtener una concentración de 20.000 células  $\cdot \text{mL}^{-1}$  en un volumen de final de 30 mL en cada matraz. Como control se utilizó sobrenadante libre de células de una especie no tóxica *Rhodomonas salina* siguiendo las mismas proporciones mencionadas anteriormente. Para cada caso, se tomó diariamente un volumen de muestra para registrar abundancia celular, y posterior a 24 horas se midió eficiencia fotosintética y actividad enzimática superóxido dismutasa.

## **12. Análisis estadístico**

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias entre los tratamientos se evaluaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de ( $p < 0,05$ ). En las figuras, los niveles de significancia se representaron como: \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ) y \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ); mientras que “ns” indica diferencias no significativas. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism, versión 8.0.1.

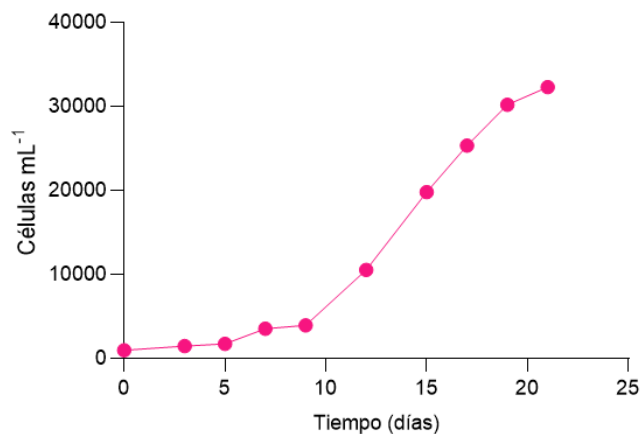
## RESULTADOS

### Resultados asociados al objetivo 1:

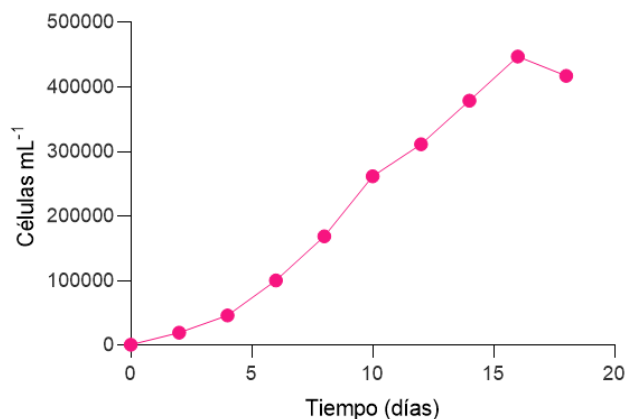
#### Curvas de crecimiento de *Karenia selliformis* y *Heterosigma akashiwo*

Las microalgas tanto tóxicas como las no tóxicas, utilizadas en esta investigación fueron cultivadas bajo estrictos parámetros controlados de irradiancia, fotoperíodo, temperatura y salinidad. Los resultados de esta actividad permitieron definir para *Karenia selliformis* una tasa de crecimiento de 1,08 div/día llegando a una densidad celular máxima promedio de 32484 células/mL, mientras que para *Heterosigma*

*akashiwo* la tasa de crecimiento fue de 2,2 div/día con una densidad celular máxima de 445.407 células/mL.



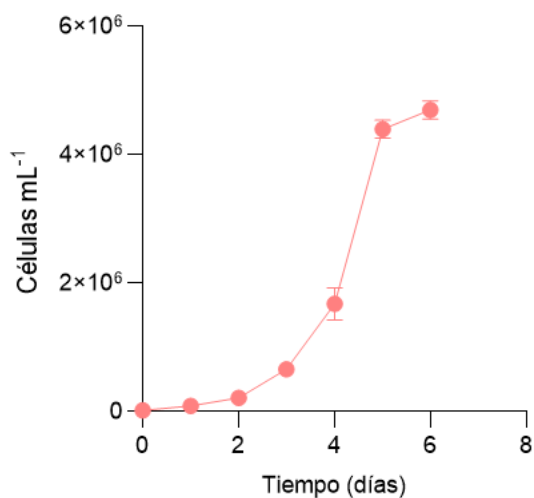
**Figura 1:** Curva de crecimiento para la cepa chilena *Karenia selliformis*, crecida en medio L1 a  $17^{\circ}\text{C}\pm 2$ , con una irradiancia  $140\ \mu\text{mol}\cdot\text{fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fotoperiodo 16h:8h (Luz:Oscuridad) y sin aireación,  $k=1,08\ \text{div. día}^{-1}$  (fase exponencial).



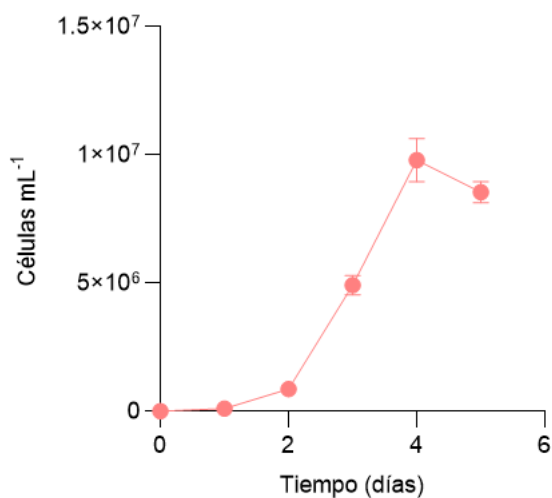
**Figura 2:** Curva de crecimiento para la cepa chilena *H. akashiwo*, crecida en medio L1 a  $17^{\circ}\text{C}\pm 2$ , con una irradiancia  $140\ \mu\text{mol}\cdot\text{fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  con fotoperiodo 16h:8h (Luz:Oscuridad) y sin aireación,  $k=2,2\ \text{div. día}^{-1}$  (fase exponencial).

### Curvas de crecimiento Bioensayos

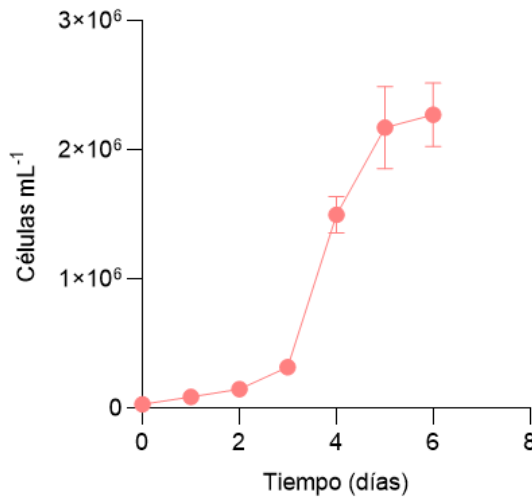
. Los resultados del crecimiento de las diatomeas *T. pseudonana*, *P. tricornatum* y la criptófita *Rhodomonas salina* se observan en la Figura 3, Figura 4 y Figura 5. A partir de estos resultados, en los cuales la tasa de crecimiento y densidad de la biomasa obtenida fue mayor para *T. pseudonana* respecto a las demás microalgas estudiadas ( $K: 3 \text{ div/día} > 2,3 \text{ y } 2,5 \text{ div/día}$ ) el manejo empírico fue más simple y visualmente con mayor evidencia de su estado fisiológicamente sano (o viable), se definió que los bioensayos alelopáticos se realizarían en *Thalassiosira pseudonana*.



**Figura 3:** Curva de crecimiento para la diatomea *Phaeodactylum tricornatum* crecida en medio L1 suplementado con sílice a 17°C, con una irradiancia  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{fotón} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  con fotoperiodo 16h:8h (Luz:Oscuridad) y sin aireación,  $k = 2,5 \text{ div. día}^{-1}$  (fase exponencial).



**Figura 4:** Curva de crecimiento para la diatomea *Thalassiosira pseudonana* crecida en medio L1 suplementado con sílice a 17°C, con una irradiancia  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{fotón} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , fotoperiodo 16:8 (Luz:Oscuridad) y sin aireación,  $k = 3,0 \text{ div. día}^{-1}$  (fase exponencial).



**Figura 5:** Curva de crecimiento para la cryptophyta *Rhodomonas salina* crecida en medio L1, con una irradiancia  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{fotón} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  con fotoperiodo 16h:8h (Luz:Oscuridad) y sin aireación,  $k=2,3 \text{ div. día}^{-1}$  (fase exponencial).

#### ***Thalassiosira pseudonana* expuesta a sobrenadante de microalgas tóxicas**

*Thalassiosira pseudonana* fue utilizada para el desarrollo de un bioensayo alelopático. Brevemente, los sobrenadantes libres de células de los cultivos de *K. selliformis* y *H. akashiwo* fueron obtenidos a partir de cultivos en fase exponencial con una densidad celular de 17911 cel/ml y 124666 cel/ml. Los resultados de la exposición a los compuestos solubles (exudados) transcurridas 24 horas desde la exposición a los sobrenadantes se presentan en la Figura 6. Se observa un aumento de densidad celular del control, similar a la determinada durante la curva de crecimiento establecida previamente (Figura 4). Por otro lado, se observa en los bioensayos expuestos a sobrenadante libre de células de *Heterosigma akashiwo* una disminución en la densidad celular de *T. pseudonana* al ser expuesto a un 33% V/V respecto al control, mientras que para el ensayo al 66% V/V no se observó un cambio significativo en la densidad del bioensayo y con un crecimiento similar al del control. Interesantemente, durante el bioensayo sobre *T. pseudonana* en los cuales se expusieron a sobrenadante libre de células de *Karenia selliformis*, no se observó un aumento en la densidad celular para el tratamiento al 33% v/v, cuya densidad (22.000 cel/ml) se mantuvo similar a la densidad celular inicial, mientras que para el tratamiento al 66% v/v se observó

una disminución de aproximadamente 6.000 cél/mL (de 20.000 inicial a 14.000 cel/mL finales).

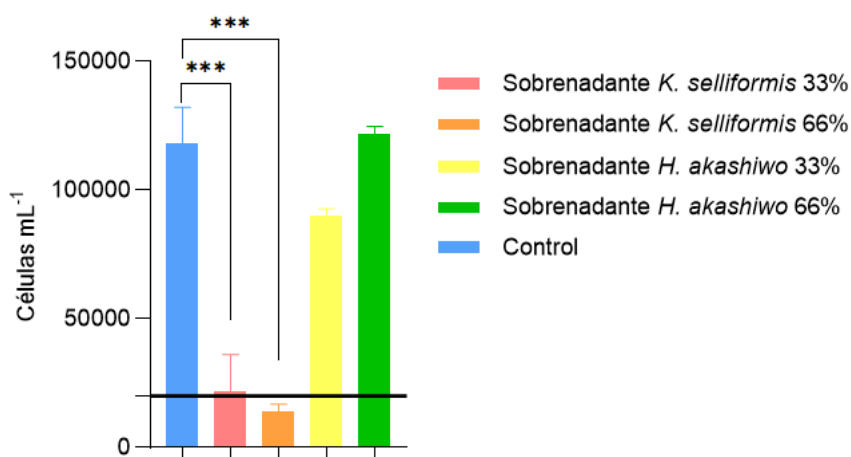
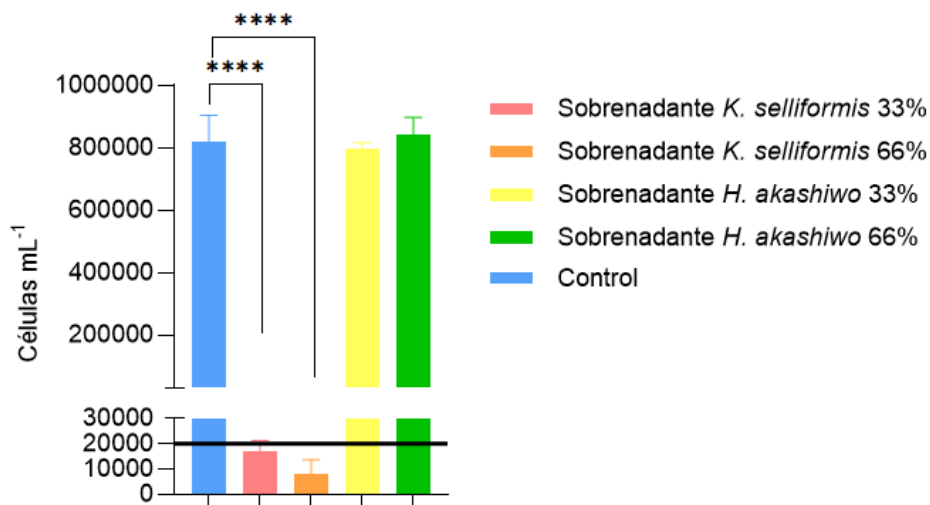


Figura 6. Densidad celular de *Thalassiosira pseudonana* después de 24 horas de exposición a sobrenadantes de cultivos de *Karenia selliformis* y *Heterosigma akashiwo* en fase exponencial, incorporados al 33% y 66%. Como control se utilizó *T. pseudonana* cultivada en medio L1 suplementado con sílice. Los valores corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar (n=3). La línea horizontal indica la densidad celular inicial del ensayo. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del control (\*\*\*) ( $p < 0,001$ )).



**Figura 7:** Densidad celular de *Thalassiosira pseudonana* después de 24 horas de exposición a sobrenadantes de cultivos de *Karenia selliformis* y *Heterosigma akashiwo* en fase exponencial, incorporados al 33% y 66%. Como control se utilizó *T. pseudonana* cultivada en medio L1 suplementado con sílice. Los valores corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar (n=3). La línea horizontal indica la densidad celular inicial del ensayo. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del control (\*\*\*) ( $p < 0,001$ )).

Los resultados del seguimiento en el tiempo de la densidad celular en el bioensayo de cada tratamiento presentado en la Figura 7, luego de 48 horas, muestran que los cultivos expuestos a sobrenadantes de *Heterosigma akashiwo*, aumentaron su densidad celular independiente del volumen de sobrenadante al que fueron expuestos, donde se observó un crecimiento similar a las células del control y similar a los resultados obtenidos a partir de la curva de crecimiento presentada en la Figura 4. Por el contrario, en los tratamientos expuestos a compuestos exudados *K. selliformis*, no se observa un aumento en la densidad celular, por el contrario, se observa en la figura 7, una disminución del 60% de la densidad celular inicial (de 20.000 a 8.000 células/mL) en el tratamiento al 66%, que fue significativamente menor que la exposición al 33% V/V en relación con el inoculo inicial (línea azul).

### Efectos alelopáticos de microalgas tóxicas sobre la eficiencia fotosintética

Los resultados de la determinación del rendimiento fotoquímico de todos los cultivos a las 24 horas post exposición a los sobrenadantes (Figura 8), determina la ausencia de un efecto en la capacidad fotosintética de las microalgas del bioensayo cuando se exponen a los exudados (sobrenadantes) de *H. akashiwo* respecto al control. Contrariamente, se observó que los valores de  $F_v/F_m$  de los tratamientos expuestos al sobrenadante de *K. selliformis*, disminuyeron significativamente respecto al control y a la exposición con *H. akashiwo*. Adicionalmente, podemos observar una relación del %v/v con la eficiencia fotosintética, tipo dosis dependiente, donde el tratamiento expuesto a un % V/volumen mayor de sobrenadante (66%) mostró una mayor inhibición del rendimiento fotoquímico que el tratamiento expuesto a un 33% v/v del sobrenadante.

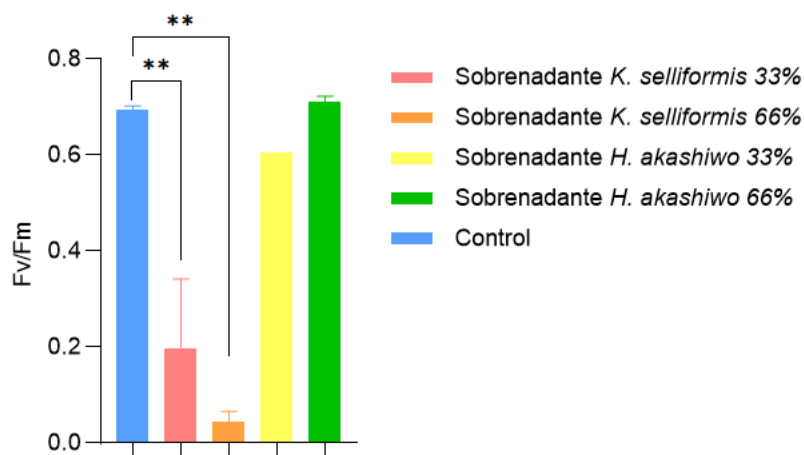


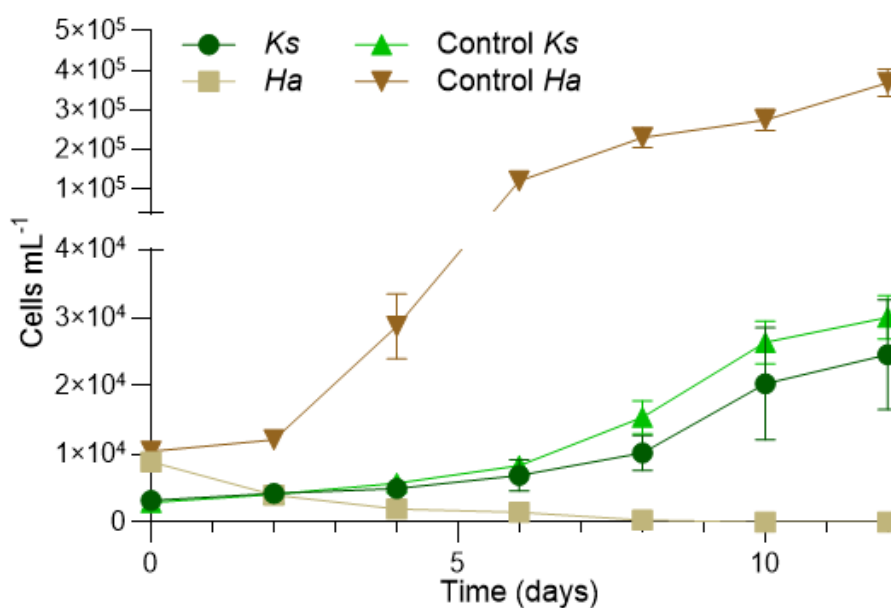
Figura 8. Eficiencia fotosintética máxima ( $F_v/F_m$ ) de *Thalassiosira pseudonana* después de 24 horas de exposición a sobrenadantes libres de células de cultivos de *Karenia selliformis* y *Heterosigma akashiwo* en fase exponencial, incorporados al 33% y 66%. Los valores corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del control (\*\* ( $p<0,01$ )).

## Resultados ligados al objetivo 2

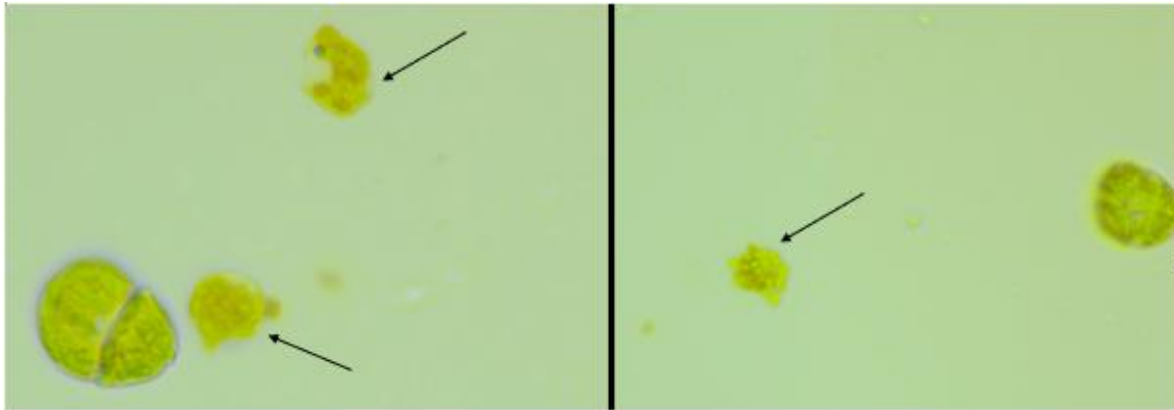
### Interacciones alelopáticas entre microalgas tóxicas *Karenia selliformis* y *Heterosigma akashiwo* en cultivos con contacto celular directo.

La ejecución de este experimento se llevó a cabo bajo estrictos parámetros controlados a partir de cultivos en fase exponencial (ver materiales y métodos 9), se utilizaron densidades de *Karenia selliformis* (15.664 cel/mL) y *Heterosigma akashiwo* (200.000 cel/mL). Se evaluó el efecto de la interacción entre las microalgas tóxicas a través de cultivos con contacto celular. Los resultados de este ensayo de coexistencia (competencia por contacto), mostró un aumento de la densidad celular de *Karenia selliformis* durante el tiempo evaluado (posterior a 48 horas) y se determinó un aumento de la densidad celular en promedio a 4133 células/ml respecto al inoculo inicial fue de 3000 células/ml y, con un crecimiento continuo similar al del control, llegando al día 12 con una densidad promedio de 24.592 cel/ml. Por otra parte, la densidad de *H. akashiwo*, mostró una evidente disminución durante el co-cultivo con *K. selliformis*, donde se observa 48 horas post coexistencia (desde el contacto celular) que la densidad de *H. akashiwo* disminuyó aproximadamente en un 44% (de 9000 células/mL a 3985 células/mL), con diferencias significativas respecto al cultivo control de *H. akashiwo*, cuya densidad celular en el control, muestra un aumento aproximado de 35% (9000 células/ml a 12.118 células/ml) en 48 horas.

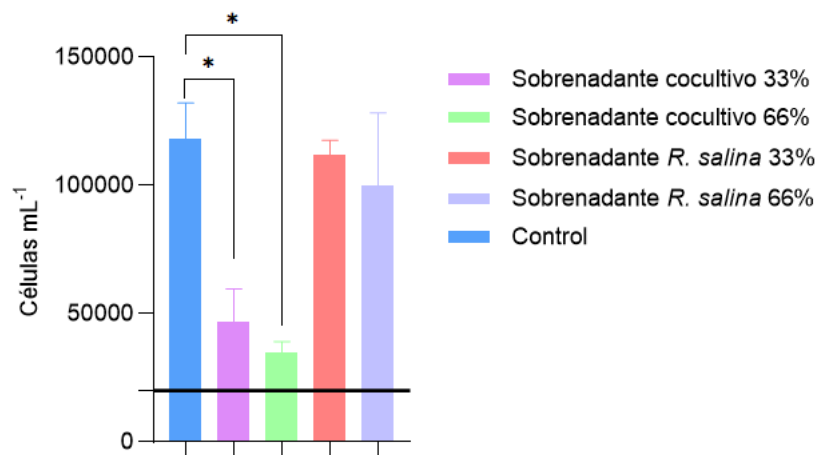
El seguimiento de este co cultivo en el tiempo, evidencia una disminución continua en la densidad de células de *H. akashiwo*, hasta la pérdida total del cultivo (0 células) para el día 8. Esto fue corroborado a través de microscopio óptico donde, además se observó que las células de *H. akashiwo* perdieron movilidad por completo, mientras que *K. selliformis* se observa sana y con movilidad normal (similar al control). En la figura 10 se presentan microfotografías de las células obtenidas de los co-cultivos donde se observan células amorfas de *H. akashiwo* y células sanas de *K. selliformis*,



**Figura 9:** Curva de crecimiento de *H.akashiwo* y *K. selliformis* en experimentos de competencia con contacto celular. Las líneas verticales representan la desviación estándar.



**Figura 10:** Microfotografías de células de *Heterosigma akashiwo* y *Karenia selliformis* obtenidas desde co-cultivos con contacto celular y observadas bajo microscopio a 400X. Las flechas indican las células *H. akashiwo* con morfologías anómalas respecto a un cultivo sano.



**Figura 11.** Densidad celular de *Thalassiosira pseudonana* después de 24 horas de exposición a sobrenadantes libres de células provenientes del cocultivo de *Karenia selliformis* y *Heterosigma akashiwo*, y de cultivos de *Rhodomonas salina*, incorporados al 33% y 66%. Como control se utilizó *T. pseudonana* cultivada en medio L1 suplementado con sílice. Los valores corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar (n=3). La línea horizontal indica la densidad celular inicial del ensayo (20.000 células mL<sup>-1</sup> en el tiempo 0). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del control (\* (p<0,05)).

En relación con los sobrenadantes libres de células de *Rhodomonas salina* frente a *T. pseudonana*, el cultivo fue expuesto a dos volúmenes de sobrenadante 33% y 66% v/v, luego de 24 horas la densidad celular del bioensayo aumentó a 112.000 cel/ml para el tratamiento al 33% y a 100.000 cel/ml para el tratamiento al 66% de sobrenadante, lo que lleva relación con el crecimiento del control (118.000 cel/ml). Del mismo modo se expusieron las células de *T. pseudonana* a dos volúmenes diferentes de sobrenadantes libres de células del co-cultivo de *H. akashiwo* y *K. selliformis*, en el tratamiento con menor volumen de sobrenadante (33%) aunque se observó un aumento en la densidad celular (47.000 cel/ml) respecto al inóculo inicial (20.000 cel/ml), de manera similar el tratamiento con volumen al 66% de sobrenadante aumentó a una densidad de 35.000 cel/ml, siendo estos resultados significativamente diferentes en referencia al control.

## DISCUSIÓN

En las interacciones alelopáticas, los compuestos químicos específicos (aleloquímicos) producidos por una especie pueden inducir daños o beneficiar a otra especie (Hakanen et al., 2014). Las interacciones aleloquímicas negativas consideran sustancias químicas liberadas por las microalgas formadores de FAN y que inducen efectos adversos en la fisiología de los protistas y depredadores que coexisten (Granéli et al., 2008). La liberación de estos compuestos da al donante una ventaja competitiva logrando desencadenar densas floraciones algales nocivas. Sin embargo, los aleloquímicos no siempre son conocidos y por tanto no están caracterizadas y es imposible cuantificarlas con los métodos químicos clásicos. Las interacciones aleloquímicas se suelen estudiar usando bioensayos por ejemplo con otra microalga o protista, y caracterizar a través de los efectos en la especie objetivo, como la inhibición del crecimiento de la población o de bioensayos basados en la actividad lítica utilizando un organismo objetivo secundario. Sin embargo, estos bioensayos requieren tiempo (para el crecimiento o el recuento de microalgas) y/o se basan en efectos letales. Por tanto, es de suma importancia la elección del organismo blanco y el uso de algún método adicional que releve la responsabilidad al analista de fitoplancton, determinación que siempre es subjetiva. Por lo que la inclusión de métodos como la fluorimetría de amplitud de pulso (PAM) se ha utilizado ampliamente para evaluar el impacto de los factores de estrés ambiental en el fitoplancton, pero rara vez para las interacciones aleloquímicas. En este trabajo hemos considerado además de evaluar medidas de observación y cuantificación de fitoplancton y condición de salud del cultivo como movimiento, incluir y evaluar el uso de la PAM para complementar la medición de los efectos del bioensayo y la determinación de la actividad de SOD como marcadores complementarios para semiautomatizar las mediciones de los efectos alelopáticos.

### Elección bioensayo

La criptófita *Rhodomonas salina* (Tillmann et al., 2007) y las diatomeas *Thalassiosira pseudonana* (Mao et al., 2021) y *Phaeodactylum tricornutum* (Wang et al., 2017) son especies ampliamente utilizadas como bioensayo, las respuestas de *R. salina* ante distintos efectos tóxicos está ampliamente documentado por distintos grupos de investigación (Fistarol et al., 2004; Tillmann et al., 2014), las diatomeas *P. tricornutum* y *T. pseudonana* también son microalgas comúnmente utilizadas como bioensayo, con la particularidad de tener una mayor resistencia frente a ciertos efectos alelopáticos que dañan la membrana celular debido a sus paredes de sílice (Wang et al., 2017). *Thalassiosira pseudonana* es una especie

ampliamente distribuida en todo el mundo que logra generar floraciones en zonas con alto contenido de nutrientes (Taylor & Harris, n.d.), *T. pseudonana* es considerado un importante modelo biológico a nivel bioquímico por ser la primera diatomea en ser secuenciada completamente (Poulson-ellestad et al., 2014).

Los resultados presentados en este estudio nos indican que *Rhodomonas salina* y las diatomeas *Thalassiosira pseudonana* y *Phaeodactylum tricornutum* son especies bastante plásticas debido a su rápida adaptación a las nuevas condiciones experimentales propuestas. *Rhodomonas salina* era inicialmente mantenida en medio Walne y dado las condiciones seteadas para los cultivos de *H. akashiwo* y *K. selliformis*, fue cambiada a medio L1, donde mostró un crecimiento rápido y exponencial que se condice con reportes anteriores en condiciones similares (Valenzuela et al. 2004). De igual forma, las diatomeas *T. pseudonana* y *P. tricornutum* fueron condicionadas a nuevos requerimientos, como nuevo fotoperiodo (inicialmente de 12:12 al requerido de 18:6) y temperatura (inicial de 20°C a 17°C). Para esta adaptación fueron cultivadas en el medio indicado para diatomeas, f/2, para luego ser acondicionadas a medio L1 suplementado con sílice. De esta forma el medio de cultivo no sería un factor para considerar frente a las respuestas alelopáticas de los sobrenadantes libres de células a los que serían expuestas. Como se describió anteriormente se realizó un seguimiento en el crecimiento de las microalgas propuestas como posibles bioensayos para esta investigación, los resultados indican que *T. pseudonana* presenta una mayor tasa de crecimiento ( $K: 3 \text{ div/día} > 2,5 \text{ y } 2,3 \text{ div/día}$ ) y una menor fase de adaptación respecto a *R. salina* y *P. tricornutum*. Por esta razón y considerando su alta sensibilidad a la alelopatía de especies como *Karenia brevis* y *Alexandrium fundyense* (Hattenrath-lehmann & Gobler, 2011) es que se seleccionó a *T. pseudonana* como la especie objetivo ideal para la evaluación los efectos alelopáticos de las microalgas tóxicas *Karenia selliformis*, *Heterosigma akashiwo* y sus co-cultivos.

#### ***Thalassiosira pseudonana* expuesta a sobrenadante de microalgas tóxicas**

A partir de los experimentos realizados los sobrenadantes libres de células de *K. selliformis* generan un efecto inhibitorio en el crecimiento de la especie objetivo tras 24 horas de exposición (Figura 6), y que guarda una relación con el % de volumen de sobrenadante al que es expuesto, ya que, a mayor volumen fue mayor la inhibición del crecimiento, mientras que a menor volumen fue menor la inhibición del crecimiento post 24 horas, aun así ninguno de los dos tratamientos mostró un aumento en la densidad celular respecto al inoculo inicial. Para el caso de *H. akashiwo* se observaron efectos de inhibición de crecimiento sólo a la concentración menor de sobrenadante, mientras que a la concentración mayor el tratamiento creció de forma similar al control. Esto sugiere que la ausencia de un efecto alelopático, lo que podría sugerir ausencia de la respuesta alelopática, pero también podría tener relación con una vida útil más corta e incluso una fragilidad de los compuestos alelopáticos liberados al de cultivo (Dorantes-Aranda et al., 2013), y que por este tipo de interferencias exista una baja concentración de las sustancias alelopáticas en el exudado, y la degradación de estos durante el ensayo. Estos resultados, se contraponen con lo reportado para *H. akashiwo*, que muestra respuestas alelopáticas frente especies como *Skeletonema costatum* (Yamasaki, Nagasoe, Matsubara, & Shikata, 2007) y que además es conocida por ser una especie que produce altos niveles de superóxido (Marshall et al., 2005), los cuales son especies reactivas de oxígeno de vida media corta. Sin embargo, algunos autores sugieren que la alelopatía de *H. akashiwo* dependerá además de la componente de competencia, de los factores abióticos como salinidad, tal como lo que se reporta en (Yamasaki et al., 2018), donde *H. akashiwo* mostró mayor efecto alelopático frente a *A. catenella* solo a salinidad de 20 psu y una densidad de cultivo mayor a la estudiada en el

presente estudio.

Posterior a 48 horas de exposición, se realizó el recuento de la densidad celular para verificar el estado de los tratamientos, los bioensayos tratados con sobrenadante de *H. akashiwo* continuaron creciendo de forma similar al control, mientras que las densidades celulares de los bioensayos expuestos a sobrenadante de *K. selliformis* disminuyeron siguiendo una relación de dosis-respuesta en relación con los %V/V al que fueron expuestos, sugiriendo que los compuestos exudados en los cultivos de *K. selliformes* son más tóxicos y estables que los potenciales compuestos alelopáticos de *H. akashiwo* bajo las condiciones estudiadas. En referencia a la naturaleza de los compuestos alelopáticos de *K. selliformes*, si bien no se conocen para esta especie en particular, (Mardones et al., 2020) descarta para esta cepa en particular que correspondan a gimnodiminas ni brevetoxinas, que han sido asociadas a otras especies o cepas de *Karenia* como *K. mikimotoi*, *K. brevis* (Brand et al., 2012) o *K. selliformis* (proveniente de Nueva Zelanda) (Enzie, 2003). Es interesante destacar que la cepa estudiada exuda estos compuestos aún sin especies competidoras, sugiriendo un rol ecológico asociado a su sobrevivencia, siendo compuestos de gran letalidad cuando son expuestos además a líneas celulares de peces y de mamíferos (datos no mostrados y contenidos en las tesis de Alvarita San Martin 2022 y Ghislayne Rios 2022).

El análisis de los efectos en la integridad del metabolismo de las células fue corroborado a través de la medición de la eficiencia fotosintética de los cultivos (Figura 8) lo que se correlaciona con lo observado previamente mediante los análisis de la densidad celular de los tratamientos. Para el caso de los sobrenadantes de *H. akashiwo* se observa un rendimiento fotoquímico similar al del control indiferente al volumen de sobrenadantes al que fueron expuestas las células, mientras que para los sobrenadantes de *K. selliformis* se observa una disminución en la eficiencia fotosintética respecto al control. Para este caso, si se observa una relación de dosis-respuesta entre el %V/V al que fueron expuestos los cultivos y la eficiencia fotosintética de los mismos. Resultados similares se observan al co-cultivar *Alexandrium pacificum* y *T. pseudonana*, donde el dinoflagelado inhibe el rendimiento fotoquímico de la diatomea (Mao et al., 2021), siguiendo la misma línea los aleloquímicos de *K. brevis* también afectan la eficiencia de la fotosíntesis en *T. pseudonana* (Zheng et al., 2021). Por tanto creemos que la inclusión de métodos como la fluorometría de amplitud de pulso (PAM) en los estudios de efectos alelopáticos es una excelente estrategia metodológica de fácil inclusión y semicuantificable, no dependiente de la expertis del analista, por lo que podría ser un buen parámetro para incluir en este tipo de estudio concordante a lo que se propone en el trabajo de (Long et al., 2018).

### **Interacciones alelopáticas entre las microalgas tóxicas *H. akashiwo* y *K. selliformis* en cultivos con contacto celular.**

En relación con los datos obtenidos en base a los experimentos realizados nos indican que existe una inhibición en el crecimiento de *H. akashiwo* al ser cultivada en contacto con *Karenia selliformis* (Figura 9), lo que sugiere un efecto alelopático de *K. selliformes* sobre *H. akashiwo*. Los cultivos fueron realizados bajo estrictos parámetros controlados de salinidad, temperatura, irradiancia, nutrientes, fotoperiodo y se utilizó el mismo medio de cultivo, por lo que se descartan factores externos que podrían haber influenciado esta respuesta. Si bien, no existen ejemplos en literatura del efecto alelopático de *K. selliformes*, se ha descrito en el trabajo de (Poulson-ellestad et al., 2014) un efecto alelopático de otra

especie del género *Karenia*, donde *Karenia brevis* muestra un evidente efecto aleloquímico sobre *T. pseudonana*, siendo letal, similar a los resultados obtenidos en este trabajo. La competencia entre microalgas se propone en diversos trabajos como un resultado de la competencia por nutrientes, luz o por la mantención de la floración (Band-Schmidt et al., 2020), lo que genera la liberación de aleloquímicos como la principal interacción entre las especies. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los aleloquímicos liberados al medio por *K. selliformis* logran dominar el medio frente a *H. akashiwo*, que hace a *Karenia* una especie dominante y capaz de ganar la sucesión entre especies en este caso.

### **Thalassiosira pseudonana expuesta a sobrenadante libre de células del co-cultivo de *H. akashiwo* y *K. selliformis***

*Rhodomonas salina* fue utilizada para evaluar el efecto del sobrenadante libre de células de una microalga no tóxica en el crecimiento de *T. pseudonana* (Figura 11), el bioensayo aumentó su densidad celular de manera regular respecto al control en ambos volúmenes de sobrenadante, estos resultados como era esperado para un microalga no tóxica, sugieren que *R. salina* no produce compuesto aleloquímicos liberados al medio que puedan afectar la viabilidad de las células objetivo, esto se condice con diversos reportes de *R. salina* como una especie no tóxica (Latsos et al., 2021). En comparación a estos resultados se observa el efecto de los sobrenadantes libres de células del co-cultivo con contacto celular de *H. akashiwo* y *K. selliformis*, si bien se observa un aumento en la densidad celular respecto al inoculo inicial este es significativamente menor al control y a las células expuestas a sobrenadante de *R. salina*, por lo que se infiere que existe un efecto dosis-dependiente de los sobrenadantes libre de células del co-cultivo de *H. akashiwo* y *K. selliformis*. Los datos obtenidos de la densidad celular de los tratamientos guardan relación con los parámetros de eficiencia fotosintética obtenidos al medir post 24 horas de exposición a los sobrenadantes (Figura 11). Si comparamos estos resultados, con los observados en el tratamiento de sobrenadante libres de células de *K. selliformis* y *H. akashiwo* en monocultivos, *Karenia selliformis* por si sola muestra una mayor supresión en la densidad celular del bioensayo *T. pseudonana* respecto a los resultados obtenidos a partir de la exposición del sobrenadante libre de células del co-cultivo.

Aunque estudios previos con *H. akashiwo* (Qiu et al., 2012; Wang, Xue, et al., 2020) y especies del género *Karenia* (Zheng et al., 2021) sugieren que en microalgas expuestas a condiciones de competencia o co-cultivo existe una tendencia al aumento de la toxicidad en el medio por compuestos alelopáticos liberados durante la competencia, en este estudio se observa una interacción diferente de los compuestos tóxicos liberados al medio sobre un bioensayo.

En referencia a las determinaciones de la enzima de superóxido dismutasa en los exudados de todos los cultivos como un marcador molecular de actividad frente especies reactivas de oxígeno, podemos mencionar que, se obtuvieron lecturas bajo el límite de detección del método, lo que podría sugerir dos potenciales explicaciones, la primera que en los bioensayos expuestos a exudados libres de células no existe una liberación significativa de la enzima al medio, lo que imposibilita su detección y esto se relacionaría con los valores bajo la curva y negativos, pero quizás el diseño metodológico requiera ser analizado en detalle. Se utilizó la metodología sugerida por (Jos et al., 2021), sin ruptura de la biomasa celular, pero dado los resultados extremadamente bajos, muy por debajo a lo que observa este autor, quizás se deba modificar el protocolo siguiendo las indicaciones de autores como (Marshall et al., 2005)

que sugieren la lisis de la biomasa microalgal antes de la cuantificación de la actividad enzimática. Por tanto, podemos sugerir que los resultados de este marcador no aportan suficiente información bajo estas condiciones analizadas y por tanto no serán considerados en la discusión final.

## CONCLUSIONES

- Es de gran importancia la elección del bioensayo a escoger en tratamientos de exposición a compuestos tóxicos no caracterizados con el fin de evitar interferencias en los resultados obtenidos, ya que los efectos pueden variar según el organismo utilizado.
- Se evidencia el efecto alelopático del sobrenadante libre de células de la microalga tóxica *Karenia selliformis* sobre el bioensayo *Thalassiosira pseudonana*, en cambio para el sobrenadante libre de células de *Heterosigma akashiwo* no se observaron efectos alelopáticos negativos sobre el bioensayo *Thalassiosira pseudonana*.
- Se evidencia el efecto alelopático de la microalga tóxica *Karenia selliformis* sobre *Heterosigma akashiwo* en co-cultivos con contacto celular, generando una disminución en su densidad celular a través del tiempo. A pesar de esto, el sobrenadante libre de células del co-cultivo presenta un efecto tóxico menor que el sobrenadante libre de células de *K. selliformis*.
- Finalmente, la hipótesis propuesta en este trabajo: “La co-existencia de las microalgas tóxicas *Heterosigma akashiwo* y *Karenia selliformis* induce un incremento en la liberación de compuestos solubles con potencial alelopático exudados al medio”, se rechaza bajo las condiciones estudiadas.

## LITERATURA CITADA

- Alexander, J., Benford, D., Boobis, A., Ceccatelli, S., Cravedi, J., Domenico, A. Di, Doerge, D., Dogliotti, E., Edler, L., Farmer, P., Fink-gremmels, J., Fürst, P., Guerin, T., Knutsen, H. K., Livesey, C., Machala, M., Mutti, A., Schlatter, J., & Leeuwen, R. Van. (2009). Marine biotoxins in shellfish – Domoic acid Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain Adopted on 2 July 2009. *The EFSA Journal*, 1181, 1–61.
- Anderson, D. M., Alpermann, T. J., Cembella, A. D., Collos, Y., Masseret, E., & Montresor, M. (2012). The globally distributed genus *Alexandrium*: Multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae*, 14, 10–35. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.012>
- Band-Schmidt, C. J., Zumaya-Higuera, M. G., López-Cortés, D. J., Leyva-Valencia, I., Quijano-Scheggia, S. I., & Hernández-Guerrero, C. J. (2020). Allelopathic effects of *Margalefidinium polykrikoides* and *Gymnodinium impudicum* in the growth of *Gymnodinium catenatum*. *Harmful Algae*, 96(March 2018). <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101846>
- Berdalet, E., Fleming, L. E., Gowen, R., Davidson, K., Hess, P., Backer, L. C., Moore, S. K., Hoagland, P., & Enevoldsen, H. (2016). Marine harmful algal blooms, human health and wellbeing: Challenges and opportunities in the 21st century. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 96(1), 61–91. <https://doi.org/10.1017/S0025315415001733>
- Brand, L. E., Campbell, L., & Bresnan, E. (2012). *Karenia*: The biology and ecology of a toxic genus. *Harmful Algae*, 14, 156–178. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.020>
- Buschmann, A. H. (2005). Marea roja y salmonicultura en el sur de Chile. *Oceana*, 1–14. [http://www.ifop.cl/mr/images/upload/file/7\\_Marea\\_Roja\\_y\\_Salmonicultura\\_en\\_el\\_Sur\\_de\\_Chile\\_Buschmann\\_2005.pdf](http://www.ifop.cl/mr/images/upload/file/7_Marea_Roja_y_Salmonicultura_en_el_Sur_de_Chile_Buschmann_2005.pdf)
- Clément, A. & Lembeye, G. 1993. Phytoplankton monitoring programme in the fish farm region of the south of Chile. In: Smayda, T.J. & Shimizu, Y. (Eds.). Toxic phytoplankton blooms in the sea. Elsevier, Amsterdam, pp. 223-228.
- Davidson, K., Whyte, C., Aleynik, D., Dale, A., Gontarek, S., Kurekin, A. A., McNeill, S., Miller, P. I., Porter, M., Saxon, R., & Swan, S. (2021). HABreports: Online Early Warning of Harmful Algal and Biotoxin Risk for the Scottish Shellfish and Finfish Aquaculture Industries. *Frontiers in Marine Science*, 8(April), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.631732>
- Deeds, J. R., Reimschuessel, R., & Place, A. R. (2006). Histopathological effects in fish exposed to the toxins from *Karlodinium micrum*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 18(2), 136–148. <https://doi.org/10.1577/H05-027.1>
- 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(1–2), 39–50. <https://doi.org/10.1127/pip/2019/0081>
- Dorantes-Aranda, J. J., Nichols, P. D., David Waite, T., & Hallegraeff, G. M. (2013). Strain variability in fatty acid composition of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) and its relation to differing ichthyotoxicity toward rainbow trout gill cells. *Journal of Phycology*, 49(2), 427–438. <https://doi.org/10.1111/jpy.12053>
- Dorantes-Aranda, J. J., Seger, A., Mardones, J. I., Nichols, P. D., & Hallegraeff, G. M. (2015). Progress in understanding algal bloom-mediated fish kills: The role of superoxide radicals, phycotoxins and fatty acids. *PLoS ONE*, 10(7), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133549>
- Enzie, A. L. I. M. A. C. K. (2003). *Gymnodimine C*, an Isomer of *Gymnodimine B*, from *Karenia selliformis*. 4838–4840.
- Fistarol, G. O., & Legrand, C. (2003). *M255P115*. 255, 115–125.
- Fistarol, G. O., Legrand, C., Selander, E., Hummert, C., Stolte, W., & Granéli, E. (2004). Allelopathy in *Alexandrium* spp.: Effect on a natural plankton community and on algal monocultures. *Aquatic Microbial Ecology*, 35(1), 45–56. <https://doi.org/10.3354/ame035045>
- Godrant, A., Rose, A. L., Sarthou, G., & David Waite, T. (2009). New method for the determination of extracellular production of superoxide by marine phytoplankton using the chemiluminescence probes MCLA and red-CLA. *Limnology and Oceanography: Methods*, 7(OCT), 682–692. <https://doi.org/10.4319/lom.2009.7.682>
- Granéli, E., Weberg, M., & Salomon, P. S. (2008). Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species: The role of eutrophication. *Harmful Algae*, 8(1), 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.08.011>
- Hakanen, P., Suikkanen, S., & Kremp, A. (2014). Allelopathic activity of the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*: Intra-population variability and response of co-occurring dinoflagellates. *Harmful Algae*, 39, 287–294. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.08.005>
- Hallegraeff, G. M. (2010). Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: A formidable predictive challenge. *Journal of Phycology*, 46(2), 220–235. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00815.x>
- Hallegraeff, G.M., Dorantes-Aranda, J.J., Mardones, J.I. & Seger, A. 2017. Review of progress in our understanding of fish-killing microalgae: implications for management and mitigation. In: Proença, L.A.O. & Hallegraeff, G.M. (Eds.). Marine and fresh-water harmful algae. Proceedings

- of the 17th International Conference on Harmful Algae. International Society for the Study of Harmful Algae and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris.
- Hattenrath-lehmann, T. K., & Gobler, C. J. (2011). Allelopathic inhibition of competing phytoplankton by North American strains of the toxic dinoflagellate, *Alexandrium fundyense*: Evidence from field experiments, laboratory experiments, and bloom events. *Harmful Algae*, 11, 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.08.005>
- Hennon, G. M. M., & Dyhrman, S. T. (2020). Progress and promise of omics for predicting the impacts of climate change on harmful algal blooms. *Harmful Algae*, 91(June 2019), 101587. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.03.005>
- Jos, L., Band-schmidt, C. J., Zenteno-sav, T., Leyva-valencia, I., Judith, C., & Muñoz-ochoa, M. (2021). *Cell Death and Metabolic Stress in Gymnodinium catenatum Induced by Allelopathy*. 1–23.
- Latif, S., Chiapusio, G., & Weston, L. A. (2017). Allelopathy and the Role of Allelochemicals in Plant Defence. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 82). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2016.12.001>
- Latsos, C., Bakratsas, G., Moerdijk, T., Houcke, J. Van, & Timmermans, K. R. (2021). Effect of salinity and pH on growth, phycoerythrin, and non-volatile umami taste active compound concentration of *Rhodomonas salina* using a D-optimal design approach. *Journal of Applied Phycology*, 3591–3602. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02547-4>
- León-Munõz, J., Urbina, M. A., Garreaud, R., & Iriarte, J. L. (2018). Hydroclimatic conditions trigger record harmful algal bloom in western Patagonia (summer 2016). *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19461-4>
- Ling, C., & Trick, C. G. (2010). Expression and standardized measurement of hemolytic activity in *Heterosigma akashiwo*. *Harmful Algae*, 9(5), 522–529. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2010.04.004>
- Long, M., Tallec, K., Soudant, P., Lambert, C., Le Grand, F., Sarthou, G., Jolley, D., & Hégaret, H. (2018). A rapid quantitative fluorescence-based bioassay to study allelochemical interactions from *Alexandrium minutum*. *Environmental Pollution*, 242, 1598–1605. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.119>
- Mao, X., Xu, R., Gao, Y., Li, H., Liu, J., & Yang, W. (2021). Ecotoxicology and Environmental Safety Allelopathy of *Alexandrium pacificum* on *Thalassiosira pseudonana* in laboratory cultures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 215, 112123. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112123>
- 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. <https://doi.org/10.3856/vol48-issue2-fulltext-2400>
- Mardones, J. I., Dorantes-Aranda, J. J., Nichols, P. D., & Hallegraeff, G. M. (2015). Fish gill damage by the dinoflagellate *Alexandrium catenella* from Chilean fjords: Synergistic action of ROS and PUFA. *Harmful Algae*, 49, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.09.001>
- Mardones, J. I., Fuenzalida, G., Zenteno, K., Alves-de-Souza, C., Astuya, A., & Dorantes-Aranda, J. J. (2019). Salinity-growth response and ichthyotoxic potency of the Chilean *Pseudochattonella verruculosa*. *Frontiers in Marine Science*, 6(FEB), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00024>
- Mardones, J. I., Norambuena, L., Paredes, J., Fuenzalida, G., Dorantes-Aranda, J. J., Chang, K. J. L., Guzmán, L., Krock, B., & Hallegraeff, G. (2020). Unraveling the *Karenia selliformis* complex with the description of a non-gymnodimine producing Patagonian phylotype. *Harmful Algae*, 98(April). <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101892>
- Mardones, J. I., Paredes, J., Godoy, M., Suarez, R., Norambuena, L., Vargas, V., Fuenzalida, G., Pinilla, E., Artal, O., Rojas, X., Dorantes-Aranda, J. J., Lee Chang, K. J., Anderson, D. M., & Hallegraeff, G. M. (2021). Disentangling the environmental processes responsible for the world's largest farmed fish-killing harmful algal bloom: Chile, 2016. *Science of the Total Environment*, 766(January 2021), 144383. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144383>
- Marshall, J. A., Nichols, P. D., Hamilton, B., Lewis, R. J., & Hallegraeff, G. M. (2003). Ichthyotoxicity of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) to damselfish (*Acanthochromis polykanthus*): The synergistic role of reactive oxygen species and free fatty acids. *Harmful Algae*, 2(4), 273–281. [https://doi.org/10.1016/S1568-9883\(03\)00046-5](https://doi.org/10.1016/S1568-9883(03)00046-5)
- Marshall, J. A., Ross, T., Pyecroft, S., & Hallegraeff, G. (2005). Superoxide production by marine microalgae: II. Towards understanding ecological consequences and possible functions. *Marine Biology*, 147(2), 541–549. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-1597-6>
- Martín, R., García, T., Sanz, B., & Hernández, P. E. (1996). Biotoxinas marinas: intoxicaciones por el consumo de moluscos bivalvos/Seafood toxins: poisoning by bivalve consumption. *Food Science and Technology International*, 2(1), 13–22. <https://doi.org/10.1177/108201329600200102>
- Mohamed, Z. A., & Al-Shehri, A. M. (2012). The link between shrimp farm runoff and blooms of toxic *Heterosigma akashiwo* in Red Sea coastal waters. *Oceanologia*, 54(2), 287–309. <https://doi.org/10.5697/oc.54-2.287>
- Montes, R. M., Rojas, X., Artacho, P., Tello, A., & Quiñones, R. A. (2018). Quantifying harmful algal bloom thresholds for farmed salmon in southern Chile. *Harmful Algae*, 77(June), 55–65.

- <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.05.004>
- Moore, S. K., Johnstone, J. A., Banas, N. S., & Salathé, E. P. (2015). Present-day and future climate pathways affecting *Alexandrium* blooms in Puget Sound, WA, USA. *Harmful Algae*, 48, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.06.008>
- Park, B. S., Kim, J. H., Kim, J. H., Baek, S. H., & Han, M. S. (2018). Intraspecific bloom succession in the harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* (Dinophyceae) extended the blooming period in Korean coastal waters in 2009. *Harmful Algae*, 71, 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.12.004>
- Peng, J., Place, A. R., Yoshida, W., Anklin, C., & Hamann, M. T. (2010). Structure and absolute configuration of karlotoxin-2, an ichthyotoxin from the marine dinoflagellate *karlodinium veneficum*. *Journal of the American Chemical Society*, 132(10), 3277–3279. <https://doi.org/10.1021/ja9091853>
- Pezzolesi, L., Cucchiari, E., Guerrini, F., Pasteris, A., Galletti, P., Tagliavini, E., Totti, C., & Pistocchi, R. (2010). Toxicity evaluation of *Fibrocapsa japonica* from the Northern Adriatic Sea through a chemical and toxicological approach. *Harmful Algae*, 9(5), 504–514. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2010.03.006>
- Pizarro, G., Garrido, C., Zamora, C., Alarcon, C., Raimapo, R., Salgado, P., Pacheco, H., Guzmán, L., Paz, B., Álvarez-Chaver, P., & Faure, M. T. (2015). Distribución de *Alexandrium catenella* y de toxinas paralizantes en el fitoplancton y mariscos entre el estrecho de magallanes y tierra del fuego (primavera 2010). *Ciencia y Tecnología Del Mar*, 36(Primavera 2010), 36–68.
- Poulson-ellestad, K. L., Jones, C. M., Roy, J., Viant, M. R., & Fernández, F. M. (2014). *Metabolomics and proteomics reveal impacts of chemically mediated competition on marine plankton*. 111(24). <https://doi.org/10.1073/pnas.1402130111>
- Powers, L., Creed, I. F., & Trick, C. G. (2012). Sinking of *Heterosigma akashiwo* results in increased toxicity of this harmful algal bloom species. *Harmful Algae*, 13, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.007>
- Qiu, X., Yamasaki, Y., Shimasaki, Y., Gunjikake, H., Honda, M., Kawaguchi, M., Matsubara, T., Nagasoe, S., Etoh, T., Matsui, S., Honjo, T., & Oshima, Y. (2012). Allelopathy of the raphidophyte *Heterosigma akashiwo* against the dinoflagellate *Akashiwo sanguinea* is mediated via allelochemicals and cell contact. *Marine Ecology Progress Series*, 446, 107–118. <https://doi.org/10.3354/meps09476>
- Sandoval, C., Paredes, E., Mejia, M., Aguilera, A., & Uribe, C. (2017). Floraciones algales nocivas y su impacto en peces. *Revista Versión Diferente Salmón-Acuicola*, 26, 12–15.

- Sar, E. A., & Ferrario, M. E. (n.d.). *Sur Americano*.
- Suárez, B., & Guzmán, L. (2005). Mareas rojas y toxinas marinas. *Editorial Universitaria. Santiago de Chile*, 1–56.  
<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Mareas+rojas+y+toxinas+mari+nas#1>
- Taylor, P., & Harris, A. S. D. (n.d.). *European Journal of Phycology Thalassiosira species ( Bacillariophyceae ) from a Scottish sea-loch. November 2014*, 37–41.  
<https://doi.org/10.1080/09670269500650881>
- Tillmann, U., John, U., & Cembella, A. (2007). On the allelochemical potency of the marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* against heterotrophic and autotrophic protists. *Journal of Plankton Research*, 29(6), 527–543. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbm034>
- Tillmann, U., Kremp, A., Tahvanainen, P., & Krock, B. (2014). Characterization of spirolide producing *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) from the western Arctic. *Harmful Algae*, 39, 259–270. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.08.008>
- Townhill, B. L., Tinker, J., Jones, M., Pitois, S., Creach, V., Simpson, S. D., Dye, S., Bear, E., & Pinnegar, J. K. (2018). Harmful algal blooms and climate change: exploring future distribution changes. *ICES Journal of Marine Science*, 75(6), 1882–1893.  
<https://doi.org/10.1093/icesjms/fsy113>
- Trainer, V. L., Moore, S. K., Hallegraeff, G., Kudela, R. M., Clement, A., Mardones, J. I., & Cochlan, W. P. (2020). Pelagic harmful algal blooms and climate change: Lessons from nature's experiments with extremes. *Harmful Algae*, 91(March), 101591.  
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.03.009>
- Van Wagoner, R. M., Deeds, J. R., Satake, M., Ribeiro, A. A., Place, A. R., & Wright, J. L. C. (2008). Isolation and characterization of karlotoxin 1, a new amphipathic toxin from *Karlodinium veneficum*. *Tetrahedron Letters*, 49(45), 6457–6461. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.08.103>
- Vargas, E. C., Artavia, K. B., & Boza Abarca, J. (2016). Floraciones algales nocivas durante el periodo 2008-2010 en el Golfo de Nicoya, Costa Rica Harmful algal blooms during 2008-2010 in the Gulf of Nicoya, Costa Rica. *Rev. Mar. Cost*, 8(1), 129–149. <https://doi.org/10.15359/revmar.8-1.9>
- Villarroel G, O. (2004). Detección de toxinas paralizante, diarreica y amnésica en mariscos de la XI región por cromatografía líquida de alta resolución(HPLC) y bioensayo en ratones. *Ciencia y Tecnología Del Mar*, 27(2), 33–42.
- Wang, R., Wu, J., Zhou, S., Cao, R., & Chan, L. L. (2020). A preliminary study on the allelopathy and toxicity of the dinoflagellate *Karlodinium veneficum*. *Marine Pollution Bulletin*, 158(September),

111400. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111400>
- Wang, R., Xue, Q., Wang, J., & Tan, L. (2020). Competitive interactions between two allelopathic algal species: *Heterosigma akashiwo* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Biology Research*, 16(1), 32–43. <https://doi.org/10.1080/17451000.2019.1702213>
- Wang, R., Xue, Q., Wang, J., Tan, L., Zhang, Q., Zhao, Y., & Anderson, D. M. (2017). Effects of an allelochemical in *Phaeodactylum tricornutum* filtrate on *Heterosigma akashiwo*: Morphological, physiological and growth effects. *Chemosphere*, 186, 527–534. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.024>
- Wu, N., Tong, M., Gou, S., Zeng, W., Xu, Z., & Jiang, T. (2021). Hemolytic Activity in Relation to the Photosynthetic System in *Chattonella marina* and *Chattonella ovata*. *Marine Drugs*, 19(6), 336. <https://doi.org/10.3390/md19060336>
- Yamasaki, Y., Fujita, M., Kawano, S., & Baba, T. (2018). *Effect of salinity on interspecific competition between the dinoflagellate Alexandrium catenella and the raphidophyte Heterosigma akashiwo*. 81, 73–82.
- Yamasaki, Y., Nagasoe, S., Matsubara, T., & Shikata, T. (2007). *Allelopathic interactions between the bacillariophyte Skeletonema costatum Allelopathic interactions between the bacillariophyte Skeletonema costatum and the raphidophyte Heterosigma akashiwo*. March 2014. <https://doi.org/10.3354/meps339083>
- Yamasaki, Y., Nagasoe, S., Matsubara, T., Shikata, T., Shimasaki, Y., Oshima, Y., & Honjo, T. (2007). Allelopathic interactions between the bacillariophyte *Skeletonema costatum* and the raphidophyte *Heterosigma akashiwo*. *Marine Ecology Progress Series*, 339(Honjo 1993), 83–92. <https://doi.org/10.3354/meps339083>
- Zheng, J., Mao, X., Ye, M., Li, H., Liu, J., & Yang, W. (2021). Allelopathy and underlying mechanism of *Karenia mikimotoi* on the diatom *Thalassiosira pseudonana* under laboratory condition. *Algal Research*, 54(August 2020), 102229. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102229>