

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo



Dinámica espacio–temporal del fitoplancton de la bahía Samborombón y caracterización integral de especies ictiotóxicas

Trabajo de tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Naturales
2025

Autora
Delfina Aguiar Juárez

Directores
Inés Sunesen
Ricardo Silva

A mis padres Irene y Pepé, y a mi hermano Jerónimo,
los quiero mucho.

Agradecimientos

Esto va a ser un poco largo porque hay mucha gente a la que quiero agradecer y abrazar, pero no puedo empezar de otra forma que no sea agradeciendo a la Universidad Nacional de La Plata y a la Facultad de Ciencias Naturales y Museo. La educación pública transformó mi vida para siempre.

Gracias a mis directoras Inés Sunesen y Eugenia Sar. Ine: tu generosidad y espíritu resolutivo, tu capacidad para resumir caracteres de alguna *Thalassiosira*, tu buena predisposición, gracias infinitas. Gracias por escucharme, aguantar mis humores y hacer del laboratorio 9 un lugar hermoso. Euge: desde que te conocí en los teóricos de Sistemática I supe que eras una persona digna de admiración. Gracias por tu honestidad, tus palabras y tu ánimo de trabajo. Gracias a ambas por enseñarme tanto.

Gracias a mis compañeros de laboratorio Jonás Tardivo Kubis y Andrea Lavigne. Jony: gracias por las charlas, los consejos y por bancarme. Andre: siempre te recuerdo, gracias por tu cariño y la ayuda con las diatomeas cuando Ine no estaba cerca.

Sigo con la juventud ficóloga: Julieta Antoni, Elena Fabro, Rocío Gorbarán, Martina Mascioni, Julián Simonato, Jonás Tardivo Kubis. Cada uno de ustedes aportó a esta tesis (y a quien la escribe) apoyo, congresos, mates, almuerzos, birras, aprendizajes. Siempre acompañados de alguna buena catarsis. Gracias por todo. Mención especial a los que respondieron a todos mis pedidos de auxilio: Marti (todas las notas, análisis, scripts, árboles, convocatorias, lista infinita de cosas que generosamente has compartido) y Jony, a ambos harté de tanto pedirles que me “corran los análisis”.

A las y los investigadores de la División Ficología, con quienes tuve el gusto de compartir y que, de distintas formas, han acompañado estos años. Gracias a Gastón Almandoz, María Adela Casco, María Isabel Delgado, José María Guerrero, Anabel Lamaro, María Elicia Mac Donagh, Silvia Sala, Amelia Vouilloud. Y un agradecimiento especial a mi estimado Dr. Ricardo Echenique. Richard, amigo, gracias por todos los cafecitos, las charlas y la ayuda con las cianobacterias.

A las y los pasantes con quienes tuve el gusto de trabajar y de formarme: Lautaro Chedreuy, Cecilia Gonano y Zoe Rodríguez Marvaldi. Estuvieron al pie del cañón siempre. Gracias por su buena onda, ganas y actitud.

Gracias a mis colegas y amigos chilenos: Ana Flores-Leñero y Jorge Mardones. Me dieron la bienvenida en su laboratorio, me enseñaron y compartieron conmigo las grandezas del sur chileno. Gracias también a Gonzalo Fuenzalida, Luis Norambuena, Javier Paredes-Mella y Marco Antonio Pinto Torres, quienes generosamente me ayudaron y enseñaron en mis estadías. Otro agradecimiento a Cristian Carrasco, las dos veces me abrió las puertas de su casa y me hizo sentir como en la mía.

Nada de lo que estoy agradeciendo hubiera sido posible si no fuera por las personas que me dieron muestras o me abrieron las tranqueras. Gracias a Ricardo Silva y a las y los investigadores del INIDEP por las muestras, al personal de Tapera de López, al Vasco de Cerro de la Gloria y también al personal de Áreas Naturales Protegidas por los permisos.

Gracias a las personas que eligieron aprender de fitoplancton, regalarme un finde en la playa y ser parte de algún muestreo. Gracias a Emmanuel Zufiaurre por tantos muestreos, apoyo y horas dedicadas a ayudarme con los datos. Gracias a las y los técnicos de los MEB y MET que anduve visitando, especialmente a Fabián Tricarico.

Gracias a mis compas de los jueves a la mañana de Introducción a la Taxonomía, siempre dándome ánimo. Gracias a mis compañeras y compañeros de La Vida en las Lagunas, ir a Chasco siempre me dio una barrita más de vida.

A mis amigos que, quizás sin saberlo, han estado formando parte de todo esto. Gracias especialmente a Esteban Fogolin, Patricio García, Facundo lacona, Tomás Laguens y Valentín Nieto.

Un pilar fundamental en la realización de esta tesis: mis amigas. A riesgo de parecer dramática (si soy), no hubiera llegado hasta acá sin su apoyo y contención. Les debo mucho y aprovecho esta oportunidad para agradecerles su amor. Especialmente a Carolina Bianconi, Juliana Colli, Emilia Cortez, Camila Deutsch, Camila Ferrer, Clara García Plandolit, Agustina Lemos, Florencia Medina, Amalia Salimbeni, Lucía Sánchez, Miranda Sánchez, Eugenia Scardamaglia, Belén Venice.

No estás en el párrafo de amigas porque no solo somos amigas, fuimos *roomies*. Martina Herrera: gracias por escucharme y bancarme, por las risas, la complicidad, los bailes. Gracias por tu compañerismo, amistad y un 2024 tan divertido.

Gracias a los amores y compañeros de mi vida: Ámbar, Mágico y Sambo. Vivieron todo este proceso dándome mimos y ronroneos. El mundo es menos hostil cuando están mis gatitos cerca.

A mi familia todo mi amor y agradecimiento. Irene, Pepé y Jerónimo: gracias para siempre por su apoyo incondicional en todo. Vinieron a muestrear, me llevaron al museo los días de lluvia, me fueron a buscar a Chile después de mis andanzas académicas. Siempre presentes, acompañando y con ganas de darme una mano. Gracias. Los quiero mucho y es por esto, y muchísimo más, que esta tesis está dedicada a ustedes.

Gracias a todas las personas que han formado parte de mi vida estos últimos seis años, incluida la gente maravillosa que conocí desde Illex, mi alter ego y cable a tierra, porque de alguna forma colaboraron con mi desarrollo personal y académico.

Ya que abrí el telón con la Universidad, voy a cerrarlo agradeciendo al CONICET, que me otorgó una beca allá por el 2019 y permitió la existencia de esta tesis.

Índice

Agradecimientos.....	3
Índice	6
Resumen	10
Abstract.....	13
Trabajos publicados	16
Capítulo 1: Introducción General	17
1.1 – El fitoplancton y su rol en los ecosistemas.....	17
1.2 – Floraciones algales nocivas.....	17
1.3 – Los estuarios como sistemas productivos	20
1.4 – El estuario del Río de la Plata	20
1.5 – Floraciones algales nocivas en el estuario del Río de la Plata	23
1.6 – Justificación de la tesis y objetivos	24
Capítulo 2: Materiales y Métodos	26
2.1 – Recolección de muestras y obtención de datos	26
2.1.1 Muestreos realizados desde embarcación	26
2.1.2 Muestreos realizados desde la costa.....	27
2.2 – Análisis de las muestras	29
2.2.1 Muestras vivas y cultivos	29
2.2.2 Preparación del material para análisis de muestras cualitativas	29
2.2.2.1 Montaje de material en preparados fijos para su observación con microscopio óptico.....	29
2.2.2.2 Montaje de material en preparados fijos para su observación con microscopio electrónico de barrido.....	30
2.2.2.3 Preparación del material para su observación en microscopio electrónico de transmisión	31
2.2.3 Análisis de muestras cualitativas	32
2.2.3.1 Microscopía óptica.....	32
2.2.3.2 Microscopía electrónica de barrido	32
2.2.3.3 Microscopía electrónica de transmisión.....	33
2.2.4 Análisis de muestras cuantitativas	33

2.3 – Análisis moleculares	34
2.4 – Análisis de pigmentos	35
2.5 – Experimentos	36
2.5.1 Tasas de crecimiento	36
2.5.2 Ensayos de citotoxicidad con líneas celulares	37
2.5.2.1 Cultivo y mantenimiento de líneas celulares RTgill–W1.....	37
2.5.2.2 Experimentos de viabilidad celular	37
2.6 – Producción de anión superóxido	40
2.7 – Extracción y análisis de toxinas PST	40
2.8 – Análisis estadísticos, mapas y figuras	41
Capítulo 3: Composición y dinámica espacio–temporal del fitoplancton	42
3.1 – Introducción.....	42
3.2 – Metodología.....	44
3.3 – Resultados.....	46
3.3.1 Campañas realizadas desde embarcaciones (2016 – 2018)	46
3.3.1.1 Características físicas	46
3.3.1.2 Abundancia, biomasa y composición del fitoplancton. Variación espacio– temporal.....	49
3.3.1.2.1 Diatomeas	52
3.3.1.2.2 Dinoflagelados.....	53
3.3.1.2.3 Clorofíceas.....	54
3.3.1.2.4 Prasinofíceas	54
3.3.1.2.5 Cianobacterias.....	55
3.3.1.2.6 Fitoflagelados	55
3.3.1.2.7 Otros grupos.....	56
3.3.2 Campañas realizadas desde la costa (2019 – 2021)	58
3.3.2.1 Características físicas generales del agua. Variación temporal	58
3.3.2.2 Abundancia y biomasa del fitoplancton durante todo el período de estudio	61
3.3.2.3 Distribución y estructura temporal de los grupos fitoplanctónicos	63
3.3.2.3.1 Diatomeas	63
3.3.2.3.2 Clorofíceas.....	63
3.3.2.3.3 Fitoflagelados	64

3.3.2.3.4 Dinoflagelados.....	64
3.3.2.3.5 Cianobacterias.....	64
3.3.2.3.6 Prasinofíceas	65
3.3.2.3.7 Otros grupos.....	65
3.3.2.4 Relación entre la abundancia y biomasa con las variables abióticas	67
3.4 Discusión.....	69
3.4.1 Tendencias generales de abundancia y biomasa fitoplanctónica	69
3.4.2 Composición fitoplanctónica	72
3.5 Conclusiones	74
Capítulo 4: <i>Chattonella marina</i>	76
4.1 – Introducción.....	76
4.2 – Metodología.....	79
4.3 – Resultados.....	80
4.3.1 Descripción morfológica	80
4.3.2 Ocurrencia de <i>Chattonella</i> en la bahía Samborombón	82
4.3.3 Filogenia.....	83
4.3.4 Análisis de pigmentos	84
4.3.5 Tasas de crecimiento	85
4.3.6 Experimentos con líneas celulares.....	86
4.3.7 Producción de anión superóxido	87
4.4 – Discusión	88
Capítulo 5: <i>Fibrocapsa japonica</i>	94
5.1 – Introducción.....	94
5.2 – Metodología.....	96
5.3 – Resultados.....	97
5.3.1 Análisis morfológico.....	97
5.3.2 Ocurrencia de <i>Fibrocapsa</i> en la bahía Samborombón	99
5.3.3 Filogenia	99
5.3.4 Análisis de pigmentos	101
5.3.5 Tasas de crecimiento	101
5.3.6 Experimentos con líneas celulares.....	102
5.4 – Discusión	103
Capítulo 6: <i>Heterosigma akashiwo</i>	108

6.1 – Introducción.....	108
6.2 – Metodología.....	111
6.3 – Resultados.....	112
6.3.1 Análisis morfológico de <i>Heterosigma akashiwo</i>	112
6.3.2 Ocurrencia de <i>Heterosigma akashiwo</i> en la bahía Samborombón	114
6.3.3 Filogenia	114
6.3.4 Análisis de pigmentos	116
6.3.5 Tasas de crecimiento	116
6.3.6 Experimentos con líneas celulares.....	117
6.4 – Discusión.....	119
Capítulo 7: <i>Gymnodinium catenatum</i> y <i>G. impudicum</i>	124
7.1 – Introducción.....	124
7.2 – Metodología.....	126
7.3 – Resultados.....	127
7.3.1 Análisis morfológico.....	127
7.3.2 Ocurrencia de <i>Gymnodinium</i> en la bahía Samborombón	130
7.3.3 Filogenia	130
7.3.4 Análisis de toxinas.....	131
6.4 – Discusión.....	133
Capítulo 8: Conclusiones generales	135
Capítulo 9: Anexos.....	145
Anexo 1.....	145
Anexo 2.....	148
Anexo 3.....	151
Anexo 4.....	154
Anexo 5.....	157
Anexo 6.....	160
Anexo 7.....	163
Anexo 8.....	165
Bibliografía.....	172

Resumen

El Río de la Plata forma uno de los sistemas estuarinos más grandes del continente. En su extremo sur se encuentra la bahía Samborombón (desde 35°27'S-56°45'O hasta 36°22'S-56°35'O), uno de los humedales mixohalinos más grandes de la región que alberga una gran biodiversidad y actúa como área de cría para distintas especies de peces, como la corvina rubia (*Micropogonias furnieri*), uno de los recursos pesqueros costeros más importantes de Argentina y Uruguay. El fitoplancton constituye la base de las tramas tróficas acuáticas y es la principal entrada de materia orgánica y energía a los ecosistemas costeros. En ocasiones, algunas especies de microalgas producen Floraciones Algales Nocivas (FAN) que impactan negativamente sobre el ambiente marino, ya sea por la producción de toxinas que se transfieren en las redes tróficas y afectan la salud humana, o por la generación de compuestos hemolíticos e ictiotóxicos que generan mortandades de peces.

Analizar la estructura del fitoplancton y sus floraciones es esencial para comprender procesos ecosistémicos. En este sentido, los objetivos principales del presente trabajo de tesis son analizar la dinámica espacio-temporal del fitoplancton de la bahía Samborombón, su composición y variabilidad, y caracterizar especies ictiotóxicas y nocivas para peces debido a la importancia del área de estudio como zona de reclutamiento de recursos pesqueros. Para abordar estos objetivos, se colectaron desde embarcaciones y desde la costa muestras cualitativas y cuantitativas de distintas zonas de la bahía Samborombón durante las cuatro estaciones del año, entre 2016 y 2021.

Las microalgas fueron identificadas con microscopio óptico y electrónico, y pertenecieron a once grupos taxonómicos de los cuales las diatomeas, clorofíceas, fitoflagelados, dinoflagelados, cianobacterias y prasinofíceas destacaron en términos de ocurrencia. Al analizar la abundancia y biomasa fitoplanctónica en las distintas estaciones del año, se encontraron altos valores anuales respecto a la literatura consultada, con un marcado incremento en primavera y verano. En general, los mayores valores de abundancia y biomasa estuvieron asociados a áreas con mayor salinidad y turbidez, con una dominancia de diatomeas de gran tamaño, clorofíceas y cianobacterias. Los valores hallados sugieren que la bahía Samborombón es un área con

una alta acumulación de recursos alimenticios, crucial para el sustento de larvas y peces.

En cuanto a las especies ictiotóxicas, fueron registradas, aisladas y cultivadas *Chattonella marina*, *Fibrocapsa japonica* y *Heterosigma akashiwo* (Clase Raphidophyceae), las cuales no habían sido previamente reportadas en la bahía Samborombón. Estas especies, reconocidas en la literatura por sus FANs asociadas a mortandades masivas de peces, son difíciles de identificar debido a la fragilidad de sus células, que comúnmente se destruyen al ser fijadas. Por esta razón, la caracterización morfológica y la variabilidad intraespecífica analizada durante distintas etapas de crecimiento del cultivo brindada en este trabajo sirven como herramienta para su identificación *in vivo*. Las secuencias genéticas de distintas cepas de estas especies obtenidas en el presente estudio representan las primeras para Argentina, y permitieron confirmar la agregación en sus respectivos clados con altos niveles de soporte. Los análisis pigmentarios mostraron variabilidad en la composición y concentración de pigmentos entre diferentes cepas dentro de una misma especie, indicando que esta metodología no es confiable para la determinación específica en este grupo. Los experimentos de tasas de crecimiento bajo distintas condiciones de temperatura y salinidad presentados en este trabajo mostraron gran variabilidad intraespecífica y adaptabilidad a estas variables, y podrían servir como base para futuros análisis fisiológicos.

Este es el primer trabajo que demuestra el potencial citotóxico de las cepas argentinas pertenecientes a la Clase Raphidophyceae, detectado a partir de bioensayos realizados con líneas celulares RTgill–W1 utilizando como tratamientos células lisadas (intracelular) e intactas (sobrenadante). Las cepas analizadas de las tres especies halladas disminuyeron la viabilidad de las líneas celulares y el tratamiento sobrenadante fue el que, generalmente, mostró mayor efecto citotóxico, sugiriendo que las células liberan activamente al medio metabolitos y sustancias tóxicas. Las especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species, ROS) fueron asociadas en la literatura a la ictiotoxicidad de estas especies. En el presente trabajo, la producción de ROS se analizó únicamente en *Chattonella marina*, y los resultados obtenidos no explicaron las diferencias en la citotoxicidad entre las cepas. Debido a que actualmente se desconoce el mecanismo exacto por el cual estas especies producen mortandades, es necesario caracterizar otros metabolitos que pueden estar contribuyendo a su citotoxicidad. Estos

resultados sugieren que las especies marinas pertenecientes a la Clase Raphidophyceae deben ser consideradas como especies objetivo en los programas de monitoreo de fitoplancton nocivo en Argentina, especialmente en áreas con bancos naturales de peces.

Dos cepas de dinofíceas, *Gymnodinium catenatum* y *G. impudicum*, conocidas en la literatura por producir FANs, fueron aisladas y analizadas. *G. catenatum* es productora de toxinas paralizantes de moluscos (TPM) y fue asociada en la literatura a un episodio de mortandad de peces, mientras que *G. impudicum* es no tóxigena y se presenta en este trabajo la primera cita para Argentina y el Atlántico Sudoccidental. Estas especies, formadoras de cadena y morfológicamente similares, fueron caracterizadas para distinguirlas bajo microscopía óptica. La reconstrucción filogenética confirmó que las secuencias de ambas cepas pertenecen a dos clados diferentes, separados por una gran distancia genética, y se presentan las primeras secuencias para Argentina de ambas especies. Los resultados de los análisis de TPM confirmaron que *G. impudicum* no es tóxigena, y que *G. catenatum* presentó un perfil dominado por C1/C2, seguido por dcGTX2/dcGTX3, GTX2 y GTX3, siendo menos tóxica que otras cepas de la misma especie provenientes de distintas regiones geográficas.

Esta tesis constituye el primer estudio que aborda específicamente el fitoplancton de la bahía Samborombón y su dinámica espacio-temporal en ciclos anuales, y el análisis de especies ictiotóxicas pertenecientes a las raphidofíceas y de especies asociadas a FANs pertenecientes a las dinofíceas, mediante un enfoque integral que incluyó microscopía óptica, electrónica de barrido y de transmisión, análisis moleculares, pigmentarios, fisiológicos, citotóxicos y toxinológicos. Los resultados obtenidos proporcionan una base para futuras investigaciones tanto en la bahía Samborombón como en otras regiones de Argentina, donde las especies ictiotóxicas pueden tener un impacto significativo.

Abstract

The Río de la Plata forms one of the largest estuarine systems in South America. At its southern end lies Samborombón bay (35°27'S-56°45'W to 36°22'S-56°35'W), one of the region's largest mixohaline wetlands, which supports high biodiversity and serves as a nursery area for various fish species, including the whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*), a key coastal fishery resource for Argentina and Uruguay. Phytoplankton forms the foundation of aquatic food webs, representing the primary input of organic matter and energy into coastal ecosystems. Occasionally, some microalgae species cause Harmful Algal Blooms (HAB), which negatively impact human activities through the production of toxins that enter the food webs and affect human health, or by releasing hemolytic and ichthyotoxic compounds that results in fish mortality.

Analyzing the structure of phytoplankton and their blooms is essential for understanding ecosystem processes. Accordingly, the main objectives of this thesis are to analyze the spatiotemporal dynamics of the phytoplankton in Samborombón bay, the community composition and variability, and to characterize ichthyotoxic and fish-harmful species, given the importance of the study area as a recruitment zone for fishery resources. To achieve these objectives, qualitative and quantitative samples were collected from vessels and coastal zones across Samborombón bay during the four seasons between 2016 and 2021.

Microalgae were identified using light and electron microscopy, and they were classified into eleven taxonomic groups. Diatoms, chlorophyceae, phytoflagellates, dinoflagellates, cyanobacteria, and prasinophyceae were the most prevalent. Analyzing phytoplankton abundance and biomass across seasons revealed high annual values compared to the literature, with marked increase during spring and summer. Higher abundance and biomass values were generally associated with areas of higher salinity and turbidity, dominated by large diatoms, chlorophyceae, and cyanobacteria. These findings suggest that Samborombón bay is an area of high food resource accumulation, critical for sustaining fish larvae and juveniles.

The ichthyotoxic Raphidophyceae *Chattonella marina*, *Fibrocapsa japonica*, and *Heterosigma akashiwo* were recorded, isolated, and cultivated. These species are

reported in this thesis for the first time in Samborombón bay. The species of this Class are known for their association with massive fish kills, and they are challenging to identify due to cell fragility, as they are often destroyed during fixation. Thus, the morphological characterization and intraspecific variability analyzed during different growth stages provided in this work serve as tools for *in vivo* identification. Genetic sequences from various strains of these species, obtained in this study, are the first for Argentina and confirmed clustering within their respective clades with high support levels. Pigment analyses revealed variability in pigment composition and concentration among strains of the same species, indicating that this method is unreliable for species determination in this group. Growth rate experiments under varying temperature and salinity conditions revealed significant intraspecific variability and adaptability, forming a basis for future physiological studies.

This is the first study demonstrating the cytotoxic potential of Argentinean Raphidophyceae strains through bioassays with RTgill–W1 cell lines with lysed cells (intracellular) and intact cells (supernatant) as treatments. Strains of all three species reduced cell viability, with supernatant treatments generally exhibiting higher cytotoxicity, suggesting active release of metabolites and ichthyotoxic substances into the medium. Reactive oxygen species (ROS) have been linked in the literature to the ichthyotoxicity of this group. In this study, ROS production was assessed only in *Chattonella marina*, however the results did not explain differences in cytotoxicity among strains. Since the exact mechanism by which these species cause fish mortalities remains unknown, further characterization of other metabolites contributing to their cytotoxicity is needed. These findings suggest that marine Raphidophyceae should be considered target species in harmful phytoplankton monitoring programs in Argentina, particularly in areas with natural fish stocks.

Two dinoflagellate strains, *Gymnodinium catenatum* and *G. impudicum*, known in the literature for producing HAB, were isolated and analyzed. *G. catenatum* produces paralytic shellfish toxins (PST) and has been associated with fish mortality episode in literature, while *G. impudicum* is non-toxic and is reported for the first time in Argentina and the southwestern Atlantic in this work. These chain-forming and morphologically similar species were characterized through distinctive traits under light microscopy. Phylogenetic reconstruction confirmed that the sequences from both strains belong to

two distinct clades, separated by a significant genetic distance, and the first sequences for Argentina of both species are presented. PST analysis confirmed that *G. impudicum* is non-toxic, while *G. catenatum* displayed a profile dominated by C1/C2, followed by dcGTX/dcGTX3, GTX2 and GTX3, being less toxic than other strains from different geographic regions.

This thesis constitutes the first study specifically addressing the phytoplankton of Samborombón bay and its annual spatiotemporal dynamics across yearly cycles. It also provides a comprehensive analysis of ichthyotoxic Raphidophyceae species and HAB-associated dinoflagellates through an integrative approach, which included optical, scanning and transmission electron microscopy, as well as molecular, pigmentary, physiological, cytotoxic, and toxinological analyses. The results provide a foundation for future research in both Samborombón bay and other regions of Argentina, where ichthyotoxic species could have significant impacts.

Trabajos publicados

Aguiar Juárez D., Mardones J.I., Flores Leñero A., Norambuena L., Paredes-Mella J., Sar E. A., Sunesen I. 2025. First description of the fish-killing raphidophyceae *Chattonella marina* in Argentina: From genetics to ichthyotoxicity unveiled. *Harmful Algae* 102804

Aguiar Juárez D., Mardones J.I., Norambuena L., Paredes-Mella J., Sar E. A., Flores-Leñero A., Sunesen I. 2025. Red tide-forming dinoflagellates from Argentinean coastal waters: Insights into *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) and first record of *G. impudicum*. *Darwiniana*. Aceptado para su publicación.

Capítulo 1

Introducción General

1.1 – El fitoplancton y su rol en los ecosistemas

El fitoplancton está constituido por organismos microscópicos y fotosintéticos que se encuentran suspendidos o presentan un movimiento relativamente pasivo en la zona fótica de una columna de agua. Estos organismos son filogenéticamente muy diversos y se distribuyen en los Dominios Bacteria, en el que se ubican las cianobacterias, y Eukarya, en el que se ubican las microalgas eucariotas (Bachy *et al.*, 2022). Desde una perspectiva morfológica, las microalgas pueden ser unicelulares o coloniales, presentando diversas formas y tamaños que varían ampliamente entre los distintos géneros y especies (Sun & Liu, 2003). Debido a su alta diversidad, por razones operativas es frecuente clasificar al fitoplancton según su tamaño en las siguientes fracciones: picoplancton (0,2-2,0 μm), nanoplancton (2,0-20 μm) y microplancton (20-200 μm) (Sieburth *et al.*, 1978).

El fitoplancton es la principal entrada de materia y energía a los ecosistemas costeros y la base de las redes tróficas en los sistemas acuáticos. Según Worden *et al.* (2015), las microalgas representan aproximadamente el 1% de la biomasa fotoautótrofa de la tierra, convierten el CO_2 en carbono orgánico a través de la fotosíntesis y son responsables de aproximadamente el 50% de la productividad primaria global. El carbono orgánico fijado se transfiere a través de las tramas tróficas, se libera a la atmósfera por respiración o degradación microbiana, o se secuestra en las profundidades del océano. A su vez, el ciclo del carbono interactúa con el ciclo de otros elementos, como el nitrógeno y la sílice, por lo que el fitoplancton es esencial en numerosos procesos biogeoquímicos (Worden *et al.*, 2015).

1.2 – Floraciones algales nocivas

Las floraciones algales o *blooms* son incrementos de biomasa de una o unas pocas especies de microalgas causados por una alta tasa de división celular, y representan procesos naturales frecuentes en ambientes costeros (Carstensen *et al.*, 2015). En algunas ocasiones, estas proliferaciones se pueden observar a simple vista ya que

originan una discoloración del agua generando manchas rojizas, pardas, marrones o verdes (Hallegraeff, 2004). Las floraciones masivas pueden deberse a un cambio en las condiciones del agua tales como la temperatura, la disponibilidad de luz o nutrientes por aporte de ríos o por procesos hidrodinámicos, y la disminución de la presión de pastoreo (Carstensen *et al.*, 2015).

Los *blooms* tienen gran importancia ecológica y bioquímica debido a que la acumulación de la biomasa producida beneficia al resto de los consumidores funcionando como fuente de alimento para moluscos, larvas de zooplancton y de peces, entre los que se encuentran especies de interés económico (Hallegraeff, 2004). Por otro lado, al exceder la respiración del sistema por la alta tasa fotosintética, favorece procesos microbianos y aumenta la deposición de carbono orgánico particulado hacia las profundidades (Carstensen *et al.*, 2015). Sin embargo, las floraciones no siempre son beneficiosas ya que en algunas ocasiones puede causar efectos negativos desde el punto de vista antrópico, por generar pérdidas económicas en la acuicultura, pesquerías y el turismo, afectando al ecosistema y a la salud humana (Hallegraeff, 2004; Anderson *et al.* 2015). A este tipo de floraciones se las denomina *Floraciones Algales Nocivas* o Harmful Algal Blooms (FAN o HAB). Entre las 5000 especies fitoplanctónicas marinas conocidas, aproximadamente 200 pueden producir FAN (Hallegraeff *et al.*, 2021).

Existen diferentes tipos de FAN: 1) aquellas producidas por especies inocuas que, debido a la gran acumulación de biomasa, generan una alta tasa de descomposición bacteriana que resulta en anoxia y puede provocar la mortandad de organismos acuáticos; 2) las causadas por microalgas que producen ficotoxinas, metabolitos naturales intracelulares, que se transfieren y bioacumulan en las tramas tróficas, afectando a la biota marina y salud humana; y 3) aquellas que no son tóxicas para las personas, pero que ocasionan daños branquiales a peces e invertebrados marinos, ya sea por su morfología (por ejemplo, una cubierta celular de sílice con prolongaciones tales como espinas) o por la producción de compuestos tóxicos para estos organismos (Hallegraeff, 2004).

Las ficotoxinas pueden clasificarse según su naturaleza química en lipofílicas e hidrofílicas, y se pueden agrupar según el síndrome que producen: envenenamiento paralizante por mariscos o paralytic shellfish poisoning (PSP) causado por dinoflagelados como *Alexandrium catenella* y *Gymnodinium catenatum*; envenenamiento por

espiroiminas en mariscos o spiroimine shellfish poisoning (SSP), generado por *Alexandrium ostenfeldii*; envenenamiento diarreico por mariscos o diarrhetic shellfish poisoning (DSP) producido por dinoflagelados como *Prorocentrum lima*, *Dinophysis acuminata* y *D. caudata*; envenenamiento por azaspirácidos o azaspiracid shellfish poisoning (AZP) generado por dinoflagelados del género *Azadinium*; envenenamiento por ciguatera o ciguatera fish poisoning (CFP) causado por dinoflagelados del género *Gambierdiscus*; envenenamiento neurotóxico por mariscos o neurotoxic shellfish poisoning (NSP) producido por dinoflagelados del género *Karenia*; envenenamiento amnésico por mariscos o amnesic shellfish poisoning (ASP) producido por diatomeas del género *Pseudo-nitzschia*; y envenenamiento por toxinas de cianobacterias o cianobacteria toxin poisoning (CTP) causado por *Microcystis aeruginosa*, entre otras (Sellner *et al.*, 2003; Hallegraeff, 2004; Ramírez *et al.*, 2022). En un contexto regional, muchas de estas especies han sido registradas tanto en las costas marinas de la Provincia de Buenos Aires como en el Mar Argentino, en zonas costeras, aguas de la plataforma y del talud continental, donde han causado eventos tóxicos (Sunesen *et al.*, 2021; Ramírez *et al.*, 2022). Además, existe una tendencia al incremento de estos eventos según la revisión histórica realizada por Ramírez *et al.* (2022).

Algunas especies no son tóxicas para las personas, pero pueden impactar sobre poblaciones de peces generando mortandades y pérdidas económicas a la piscicultura. Los mecanismos más conocidos son producción de lesiones sobre las branquias, como producen algunas especies de diatomeas del género *Chaetoceros* (por su morfología), o por producción de compuestos tóxicos como brevetoxinas o karlotoxinas (Hallegraeff, 2004; Mardones *et al.*, 2016; Hallegraeff *et al.*, 2017). En este sentido, microalgas pertenecientes a la Clase Raphidophyceae Chadeaud ex Silva, producen mortandades masivas de peces que no han podido asociarse con la producción de las ficotoxinas conocidas (Hallegraeff *et al.*, 2017; Larsen, 2023). Esta Clase representa un pequeño grupo de flagelados desnudos distribuidos cosmopolitamente, con representantes marinos y de agua dulce (Demir-Hilton *et al.*, 2012). Dentro de los marinos, los géneros que han sido asociados a FANs y daños económicos son *Chattonella*, *Fibrocapsa* y *Heterosigma* (Yamaguchi *et al.*, 2008; Imai & Yamaguchi, 2012). Entre los mecanismos propuestos para explicar la ictiotoxicidad de estos organismos, en los últimos años se ha estudiado intensivamente la producción de compuestos como las especies reactivas de

oxígeno o reactive oxygen species (ROS) (Oda *et al.*, 1997; Marshall *et al.*, 2003), la producción de ácidos grasos poliinsaturados o polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (Fossat *et al.*, 1999; Henrikson *et al.*, 2010; Mooney *et al.*, 2011) y la sinergia entre ambos (Mardones *et al.*, 2015; Larsen, 2023).

1.3 – Los estuarios como sistemas productivos

Los estuarios son un tipo de frente marino generalmente desarrollado en bahías, en los cuales el agua continental se encuentra con el agua marina (Acha *et al.*, 2015). La primera, menos salada, fluye hacia el océano por la superficie mientras que el agua marina salada y densa, lo hace por el fondo, generando frecuentemente una cuña salina (Acha *et al.*, 2015).

La interacción entre el influjo de agua dulce y el océano se encuentra balanceada por procesos químicos, físicos y biológicos, y estas dinámicas generan sistemas complejos y heterogéneos que sostienen una alta biodiversidad y productividad (Bianchi, 2007; Day *et al.*, 2013; Marcovecchio *et al.*, 2013). La elevada disponibilidad de carbono orgánico y nutrientes provenientes del continente favorece el desarrollo de una alta biomasa planctónica en los estuarios, que, en general, supera a la de aguas adyacentes y constituye una de las principales bases de su alta productividad (Berasategui *et al.*, 2021). En este sentido, los estuarios son una fuente directa de recursos de interés para la sociedad y, a su vez, ofrecen diversidad de hábitats y proveen una fuente de alimentación para especies de peces y moluscos de importancia económica que utilizan estos sistemas como área de desove y cría de juveniles (Bianchi, 2007).

1.4 – El estuario del Río de la Plata

El Río de la Plata se encuentra localizado entre los 34°00′-36°20′S y 55°00′-58°30′O y cubre un área de 35500 km² (Framiñan & Brown, 1996) (Fig. 1.1). Presenta forma de embudo con orientación NO-SE, con una longitud de 280 km y un ancho de 25 km en la cabecera y de 230 km en la boca entre Punta Rasa y Punta del Este (Mianzan *et al.*, 2001). Drena la segunda cuenca más grande de Sudamérica (aproximadamente 3,2 millones de km²) y el 97% del agua descargada proviene de sus tributarios principales, el río Paraná

y el río Uruguay (Framiñan & Brown, 1996; Gómez, 2014). La descarga anual de agua dulce exhibe una baja estacionalidad, con un máximo de $26000 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ en invierno y un mínimo de $19000 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ (Mianzan *et al.*, 2001). Asimismo, el estuario se caracteriza por presentar baja amplitud de marea (generalmente debajo de los 45 cm s^{-1}), un régimen casi permanente de cuña salina y, como presenta una amplia extensión y bajas profundidades, es susceptible al forzamiento atmosférico (Mianzan *et al.*, 2001; Acha *et al.*, 2008).

El río se encuentra dividido en dos regiones (interna y externa) por un banco de arena de poca profundidad que se extiende desde Punta Piedras hasta Montevideo llamado Barra del Indio (Framiñan & Brown, 1996) (Fig. 1.1). La región interna es un sistema con régimen fluvial bajo la influencia de las mareas, que presenta profundidades entre 1 a 5 m y salinidades menores a 0,4. La región externa forma el frente estuarial del Río de la Plata y representa un ambiente estuarino o mixohalino, con profundidades entre 5 a 25 m. Su salinidad varía entre 5 y 25 (Guerrero *et al.*, 2010), siendo altamente variable, y genera una fuerte estratificación vertical la mayor parte del tiempo, la cual se homogeniza durante períodos de vientos intensos (Acha *et al.*, 2008). La región externa constituye uno de los ambientes estuarinos más grandes y permanentemente abierto al océano del mundo (Framiñan & Brown, 1996).

El ingreso del agua marina es en forma de cuña, fluyendo por el fondo en dirección a la boca del río hasta la Barra del Indio mientras que el agua dulce lo hace por la superficie, generando un sistema con dos capas separadas por una haloclina (Mianzan *et al.*, 2001). El encuentro de aguas con distinta densidad genera un frente salino a la altura de la Barra del Indio, lo que produce floculación de la materia suspendida en la punta de la cuña y resuspensión del sedimento debido a la fricción de las mareas, generando una zona de máxima turbidez (Framiñan & Brown, 1996; Mianzan *et al.*, 2001). Este frente de turbidez se extiende desde Montevideo hasta Punta Piedras y sigue la geometría de la bahía Samborombón (Acha *et al.*, 2008).

La bahía Samborombón se encuentra en el extremo sur del estuario del Río de la Plata (Fig. 1.1) integrando la región mixohalina y se extiende desde Punta Piedras ($35^{\circ}27'S$, $56^{\circ}45'O$) hasta Punta Rasa ($36^{\circ}22'S$, $56^{\circ}35'O$) con una costa de alrededor de 140 km de longitud. Recibe la descarga de aproximadamente $26 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ provenientes principalmente del Río Salado, el Río Samborombón, el Río Ajó y un sistema de seis

canales principales (Framiñan & Brown, 1996). Esta área representa uno de los humedales mixohalinos más grandes de la región (Moreira & Simionato, 2019) y actúa como refugio de peces, cangrejos, tortugas marinas y aves migratorias, por lo que ha sido declarada sitio Ramsar desde 1997 y comprende diversas áreas protegidas (Moreira & Simionato, 2019; Amico *et al.*, 2022).

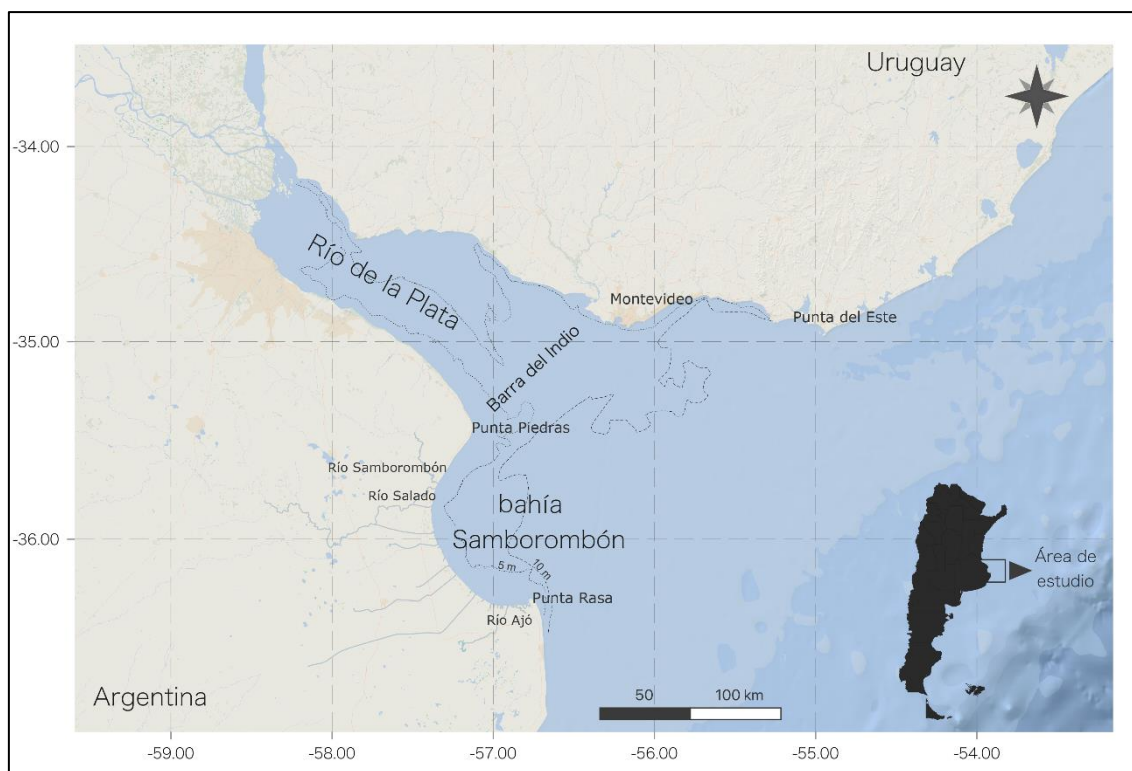


Fig. 1.1. Mapa del Río de la Plata indicando los límites de la bahía Samborombón (Punta Piedras-Punta Rasa) y el límite de la cuña salina (Barra del Indio). La batimetría se muestra en líneas punteadas.

Los primeros estudios taxonómicos del fitoplancton en el Río de la Plata fueron sobre diatomeas (Carbonell & Pascual, 1925; Frenguelli, 1933, 1941, 1945; Méndez *et al.* 1998 y referencias ahí), seguidos por estudios de dinoflagelados (Balech, 1964a; Méndez *et al.* 1998 y referencias ahí incluidas), mientras que las asociaciones fitoplanctónicas han sido estudiadas posteriormente en distintas zonas (ver Capítulo 3). Negri *et al.* (1988) han estudiado las asociaciones de primavera de la zona más externa del estuario, encontrando una dominancia de diatomeas, dinoflagelados tecados y silicoflagelados. Carreto *et al.* (2003, 2008) realizaron una transecta desde el frente de turbidez hacia la plataforma continental y encontraron que en primavera la región mixohalina se encontraba dominada por diatomeas, criptofíceas, prasinofíceas y dinoflagelados tecados. Gómez *et al.* (2004), Calliari *et al.* (2005) y Licursi *et al.* (2006)

realizaron estudios en primavera abarcando el ancho y el largo de ambas regiones del Río de la Plata y hallaron en la región dulceacuícola dominancia de clorofíceas y cianobacterias y en la región mixohalina una dominancia de diatomeas y dinoflagelados tecados.

1.5 – Floraciones algales nocivas en el estuario del Río de la Plata

El Río de la Plata ha presentado recurrentes *blooms* de especies productoras de toxinas. Dentro de las productoras de PSP, se han registrado floraciones de *Alexandrium tamarense/catenella* y *Gymnodinium catenatum* (Carreto *et al.*, 1996; Méndez & Medina, 2004) generalmente asociadas a la región costera uruguaya, en la cual se han hallado quistes de *A. tamarense/catenella* (Méndez, 2006). Estos quistes se encuentran en el bentos durante el invierno debido a las condiciones de baja salinidad producida por las descargas del río y las lluvias. En períodos de fuertes vientos y baja descarga, se pueden transportar a lo largo de la costa de la Provincia de Buenos Aires y germinar produciendo una FAN (Carreto *et al.*, 1998).

Las floraciones de *G. catenatum* en el estuario del Río de la Plata son consideradas eventos localizados (Méndez & Carreto, 2018). El primer evento tóxico de esta especie para el Atlántico Sudoccidental fue registrado en 1992 en Uruguay, donde se encontraron toxinas paralizantes en moluscos (Méndez & Carreto, 2018). Tanto en la costa argentina como en la uruguaya se han encontrado quistes de resistencia (Akselman *et al.*, 1998; Méndez & Ferrari, 2003; Méndez, 2006). En general, las floraciones de esta especie han sido registradas durante temperaturas cálidas a final del verano y en otoño temprano (Méndez & Ferrari, 2003), cuando los vientos costeros son predominantes, el caudal del río es bajo y las poblaciones de *G. catenatum* son transportadas desde la costa uruguaya hacia la argentina (Carreto *et al.*, 1998).

En relación con las especies productoras de DSP, en el estuario han sido registradas *Dinophysis acuminata*, *D. caudata* y *D. rotundata* (Ferrari *et al.*, 2000) y se han detectado toxinas asociadas a estas especies en la costa uruguaya (Méndez & Medina, 2004). Durante el verano del 2010, en aguas costeras de la Provincia de Buenos Aires, se registró por primera vez en Argentina la presencia de ácido okadaico en muestras de moluscos, junto con dinophysistoxina-1 y sus acyl-derivados. Estos

compuestos, asociados con la presencia de *D. acuminata* y *D. caudata* en el plancton, provocaron intoxicaciones en personas que requirieron de hospitalización (Sar *et al.*, 2010; Sar *et al.*, 2012).

Respecto al ASP, producido por diatomeas del género *Pseudo-nitzschia*, la presencia de ácido domoico ha sido registrada asociada a un *bloom* de *P. australis*, ocurrido en invierno en aguas costeras de Mar del Plata (Montoya *et al.*, 2000; Negri *et al.*, 2004) pero no así en la región estuarina del Río de la Plata. En el Mar Argentino, las especies más abundantes productoras de ácido domoico son *P. pungens*, *P. australis* y *P. pseudodelicatissima*, y representan componentes fitoplanctónicos frecuentes en ensamblajes de aguas templadas (Almandoz *et al.*, 2017; Ramírez *et al.*, 2022 y referencias ahí incluidas). Estas especies, junto con *P. multiseriis* y *P. turgidula* han sido registradas en áreas costeras de la Provincia de Buenos Aires cercanas al estuario (Ferrario *et al.*, 2002).

Finalmente, entre las especies productoras de ictiotoxinas o compuestos asociados a mortandad de peces, se han registrado a *Chattonella marina*, *Fibrocapsa japonica* y *Heterosigma akashiwo* en aguas costeras uruguayas cercanas al estuario durante el verano y el otoño temprano de los años 2007 y 2010, cuando la temperatura y la salinidad del agua oscilaron entre 17-22 °C y 24,7-33,4, respectivamente (Méndez *et al.*, 2013).

1.6 – Justificación de la tesis y objetivos

Si bien se han realizado estudios taxonómicos y ecológicos del fitoplancton del estuario del Río de la Plata, los mismos generalmente han sido realizados en primavera, por lo que las asociaciones a lo largo del año permanecen escasamente estudiadas. A su vez, dentro de las regiones estudiadas en todo el sistema, la bahía Samborombón no tiene estudios en particular. Esta área representa una zona de reclutamiento y cría de juveniles de peces de importancia comercial, por lo que el estudio de la composición, distribución y variación de las asociaciones fitoplanctónicas constituye una base esencial para entender el funcionamiento del sistema. Adicionalmente, las especies potencialmente productoras de ictiotoxinas o nocivas para peces han recibido escasa atención, y se desconoce en gran medida bajo qué condiciones ambientales pueden

producir floraciones. En este contexto, esta tesis tiene como objetivo principal caracterizar la comunidad fitoplanctónica de la bahía Samborombón, su composición y variabilidad espacio-temporal, y caracterizar especies ictiotóxicas y nocivas para peces, bajo la hipótesis de que la diversidad fitoplanctónica de la bahía es mayor a la reportada hasta el momento, que su densidad y biomasa varían en función de las condiciones ambientales y que, dada la dinámica del estuario, se espera encontrar especies ictiotóxicas.

Objetivos específicos:

- Realizar análisis cualitativos de muestras de fitoplancton de la bahía Samborombón para caracterizar los taxones presentes.
- Realizar análisis cuantitativos de las muestras, determinando las densidades, biovolúmenes y biomاسas específicas, y determinar la frecuencia de los grupos fitoplanctónicos observados.
- Estudiar la distribución espacio-temporal del fitoplancton.
- Analizar la presencia y abundancia de especies de algas ictiotóxicas.
- Realizar una caracterización integral, incluyendo morfología, genética, fisiología y toxicología de especies de microalgas ictiotóxicas.
- Contribuir al entendimiento de la distribución biogeográfica de especies ictiotóxicas y su ocurrencia en función de las condiciones ambientales.

Capítulo 2

Materiales y Métodos

2.1 – Recolección de muestras y obtención de datos

2.1.1 Muestreos realizados desde embarcación

Los muestreos embarcados se diseñaron y llevaron a cabo en el marco de las campañas del Proyecto “Evaluación de juveniles de corvina rubia (*Micropogonias furnieri*)” del Programa de Pesquerías de Peces Demersales Costeros del Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP). Este proyecto tiene como objetivo general determinar la variación espacio-temporal de las densidades y composición específica de los recursos ícticos de la bahía Samborombón, y uno de sus objetivos particulares es caracterizar la composición específica y la variación espacio-temporal del fitoplancton del área.

Durante las 12 campañas realizadas se obtuvieron 66 muestras de fitoplancton en un total de 20 estaciones de muestreo (Fig. 2.1) a bordo de las embarcaciones *Willie* y *Bernie* del INIDEP (Fig. 2.2A). Los detalles de las fechas y los sitios de muestreo se presentan en el Anexo 1 (Capítulo 9 Anexos). En cada estación, se colectaron muestras cuantitativas subsuperficiales (20 cm aproximadamente) utilizando botellas Niskin de 5 l. En algunos sitios se recolectaron muestras cualitativas utilizando una red de plancton de 25 μm de apertura de malla. Todas las muestras fueron fijadas con una solución de formol al 5% luego de ser colectadas.

Junto con cada muestra, se realizaron perfiles verticales de temperatura y salinidad utilizando un CTD (Sea-Bird SBE19) operado manualmente, midiendo ambas variables en la superficie y en el fondo hasta los 8 m aproximadamente (según sitio de muestreo). Los datos de turbidez fueron tomados mediante un sensor del CTD y los datos del caudal fueron provistos por el Departamento de Oceanografía Física del INIDEP.

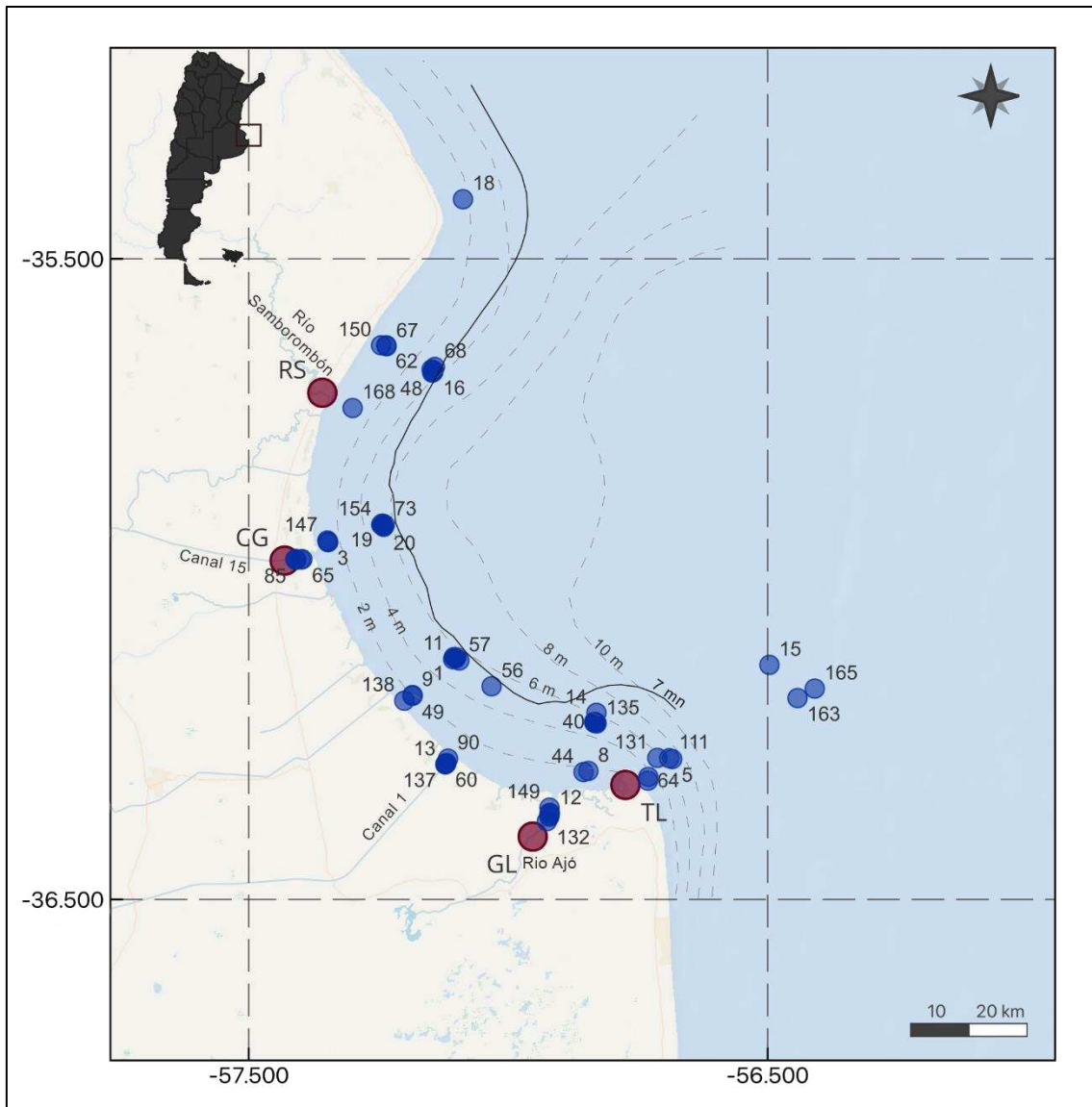


Fig. 2.1. Mapa de la bahía Samborombón indicando los puntos de muestreo. En azul se indican los sitios de colecta de los muestreos realizados desde embarcación y los números indican el número de muestra. En bordó se indican los muestreos realizados desde la costa. La batimetría se indica con líneas punteadas. Referencias: TL, Tapera de López; GL, General Lavalle; CG, Cerro de la Gloria; RS, Río Samborombón; 7 nm, 7 millas náuticas.

2.1.2 Muestreos realizados desde la costa

Los muestreos realizados desde la costa se llevaron a cabo mensualmente desde agosto del 2019 hasta diciembre del 2021, con una interrupción entre marzo y diciembre del 2020 debida a las restricciones de circulación impuestas durante la pandemia de COVID-19. Se analizaron un total de 82 muestras colectadas en 4 sitios: Tapera de López (TL), General Lavalle (GL), Cerro de la Gloria (CG) y Río Samborombón (RS) (Fig. 2.1), durante

el horario de pleamar en la mayoría de los casos, presentando una amplitud de marea de 0,9 m aproximadamente, medida desde San Clemente del Tuyú. El detalle de las fechas y los sitios de muestreo se muestran en el Anexo 2 (Capítulo 9 Anexos).

En cada sitio se colectaron muestras superficiales cuantitativas sumergiendo a mano botellas de 120 ml, y dos muestras cualitativas utilizando una red de fitoplancton de 30 μm de apertura de malla, arrastrada durante 5 minutos (Fig. 2.2B,C). La muestra cuantitativa y una de las muestras cualitativas fueron inmediatamente fijadas con una solución de formol al 4%, mientras que la otra se mantuvo viva, levemente refrigerada y en oscuridad hasta su traslado al laboratorio para la observación *in vivo* y el aislamiento de especímenes para cultivos. Junto con la toma de muestras, se registraron datos de velocidad del viento utilizando una estación meteorológica (Kestrel® 3500), y de dirección del viento, calculada con una brújula portátil (Fig. 2.2D). Adicionalmente, se registraron datos del agua como la turbidez mediante un disco Secchi (Fig. 2.2E), y de temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto superficiales (entre los primeros 10 a 15 cm) utilizando una sonda multiparámetro (HANNA HI 9828) (Fig. 2.2F). Finalmente, la marea se registró de manera cualitativa basándose en el horario de pleamar y el horario específico de cada muestreo. A partir de esta información, se codificó el estado de la marea como “alta”, “subiendo”, “bajando” o “baja”.



Fig. 2.2. Fotografías de muestreos. **A**, toma de muestras desde la embarcación *Bernie* de INIDEP para el análisis de corvina rubia en la bahía Samborombón. Imagen tomada de www.pescare.com.ar. **B-C**, colecta de muestras cualitativas de red en Cerro de la Gloria y Tapera de López, respectivamente. **D**, toma de datos ambientales en Tapera de López. **E**, toma de datos de turbidez utilizando disco Secchi en Río Samborombón. **F**, sonda multiparámetro utilizada para registrar variables del agua.

2.2 – Análisis de las muestras

2.2.1 Muestras vivas y cultivos

Las muestras de red sin fijar fueron observadas inmediatamente tras el arribo al laboratorio empleando un microscopio invertido Zeiss Axiovert 40 CFL de la División Ficología del Museo de La Plata (UNLP) para explorar la composición fitoplanctónica y aislar especies de interés (Fig. 2.3A).

Células individuales fueron aisladas bajo microscopio usando una micropipeta capilar y colocadas en portaobjetos excavados con gotas de agua de la zona, previamente filtrada, esterilizada y enriquecida con medio de cultivo Guillard f/2 (Fig. 2.3B,C). El proceso de aislamiento y lavado en gotas se repitió hasta que el espécimen seleccionado quedó libre de contaminantes. Las células fueron transferidas individualmente a una placa de cultivo de 6 pocillos con 10 ml del agua previamente tratada y enriquecida con medio de cultivo. Las placas con los aislamientos se incubaron a 16 °C bajo un régimen de 12:12 luz/oscuridad a una irradiancia de 100-125 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ con luz blanca fría de tubos fluorescentes (Fig. 2.3D). Una vez establecidas las cepas, las mismas fueron transferidas a frascos de cultivo Erlenmeyer de 100 ml con 40 ml de agua de mar, previamente tratada y enriquecida, y los cultivos se mantuvieron bajo las condiciones anteriormente descritas. El repique se realizó quincenalmente. En caso de cultivos contaminados, se repitió el proceso desde el lavado inicial hasta obtener cultivos monoalgales.

2.2.2 Preparación del material para análisis de muestras cualitativas

2.2.2.1 Montaje de material en preparados fijos para su observación con microscopio óptico

Las muestras fijadas requieren de un proceso previo para la eliminación del fijador. Se colectaron alícuotas de aproximadamente 5 ml de las muestras cualitativas y se colocaron en tubos de ensayo (Fig. 2.3E). Los mismos se llenaron hasta completar su

volumen con agua destilada y se centrifugaron durante 25 min a 2500 rpm. Este proceso se repitió 6 veces por muestra. Una vez finalizados los lavados, se descartó el sobrenadante y una fracción del material fue montado en preparados permanentes utilizando Naphrax® para observar colonias de diatomeas y frústulos enteros (Ferrario *et al.*, 1995). Los preparados se dejaron secar en una plancha térmica y se guardaron hasta su análisis.

Para la observación de los detalles y elementos de los frústulos de diatomeas, el resto del material fue sometido a un proceso de oxidación de la materia orgánica siguiendo la metodología propuesta por Prygiel & Coste (2000) levemente modificada. A cada tubo se le añadió 9 ml de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) de 100 volúmenes por cada ml de muestra. Los tubos se incubaron a 90 °C en estufa durante 24 h aproximadamente, debido a la alta cantidad de materia orgánica presente en las muestras. Posteriormente, se centrifugaron durante 30 min a 2500 rpm, el sobrenadante fue eliminado con una pipeta Pasteur y el volumen del tubo se completó nuevamente con agua destilada. Este proceso se repitió 5 veces a fin de eliminar completamente el H₂O₂. Al finalizar, el material fue montado en preparados fijos utilizando Naphrax® (Ferrario *et al.*, 1995).

2.2.2.2 Montaje de material en preparados fijos para su observación con microscopio electrónico de barrido

Para la observación de diatomeas, tanto las muestras sin tratar como las tratadas con H₂O₂ fueron montadas sobre fragmentos de portaobjetos de 5 x 5 mm y secadas en plancha térmica. Posteriormente, los fragmentos fueron fijados a un taco metálico y metalizados con oro-paladio.

Para la observación de algunos dinoflagelados mantenidos en cultivo, fue necesario realizar un procesamiento previo del material modificando ligeramente el procedimiento realizado por Fraga *et al.* (1995). Se tomaron 6 ml del cultivo, se dejaron reposar en tubos Falcon de 15 ml durante 30 min a temperatura ambiente y se fijaron con glutaraldehído 2,5%. El material fijado se filtró utilizando filtros Isopore de 3 µm de poro (TSTPO1300) y los filtros se colocaron en sobres de papel de filtro que se sumergieron en un vaso de precipitados y se lavaron 3 veces con medio de cultivo durante 15 min cada vez. A continuación, las muestras se fijaron con tetróxido de osmio (OsO₄) 1% en medio de cultivo durante 1 h a 4 °C. Para retirar el fijador, se realizaron 3

lavados con agua destilada durante 15 min cada uno. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas a 4 °C con una batería creciente de etanol al 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 96% durante 15 min en cada concentración, y dos veces en 100%. Finalizada la deshidratación, las muestras se sometieron a secado por punto crítico en un HCP-2 (Hitachi) y los filtros se montaron sobre portaobjetos de 12,7 mm de diámetro previamente cubierto con cinta adhesiva de carbón. Las muestras fueron metalizadas con oro-paladio.

2.2.2.3 Preparación del material para su observación en microscopio electrónico de transmisión

Para el análisis ultraestructural interno de algunos fitoflagelados mantenidos en cultivo fue necesario realizar un procesamiento previo del material siguiendo el procedimiento de Branco *et al.* (2019) levemente modificado. Alícuotas del cultivo se colocaron en tubos Falcon de 15 ml y se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min. Los pellets obtenidos se transfirieron a tubos Eppendorf de 1,5 ml, se les agregó medio de cultivo, se resuspendieron y dejaron reposar durante 2 h. Posteriormente, se centrifugaron a 3000 rpm y se dejaron reposar durante 30 min. Una vez procesadas, las muestras fueron fijadas con glutaraldehído al 1% en su medio de cultivo durante 60 min a temperatura ambiente. Luego, se reemplazó el fijador por glutaraldehído 2,5% en medio de cultivo y se dejaron durante la noche a 4 °C. A las 24 h, se retiró el fijador y se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con buffer cacodilato 0,1 M pH 7,2 en medio de cultivo. Finalizado este proceso, se realizó una segunda fijación de las muestras con (OsO₄) 1% en buffer cacodilato 0,1 M durante 1 h a 4 °C. Luego se efectuaron 3 lavados con agua destilada durante 10 min cada uno, se agregó acetato de uranilo acuoso 2% y las muestras se dejaron bajo campana durante 1 h a temperatura ambiente; posteriormente, se lavaron 3 veces con agua destilada durante 10 min cada vez. A continuación, las muestras fueron deshidratadas en una batería creciente de etanol al 30%, 50%, 70%, 95% durante 15 min en cada concentración, 2 veces en etanol puro durante 30 min y 2 veces en acetona absoluta (Merck) durante 15 min cada vez. Las muestras deshidratadas se dejaron en una mezcla de acetona y resina (Epon 812, Electron Microscopy Sciences) 1:1 durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se retiró la mezcla y se agregó resina pura (Epon 812, Electron Microscopy Sciences). Las muestras se colocaron en estufa con vacío a temperatura ambiente durante 8 h. Después de ese tiempo, se reemplazó la

resina añadiendo resina nueva para polimerización y las muestras se dejaron en estufa a 60 °C por 24 h.

Se realizaron cortes ultrafinos de 70 nm con cuchilla de diamante utilizando un ultramicrotomo Leica EM UC7, los cuales se recolectaron en rejilla de Cu de 200 de malla (Electron Microscopy Sciences) y se tiñeron con acetato de uranilo en metanol 2% durante 2 min y citrato de plomo durante 5 min. Adicionalmente, se realizaron cortes semifinos de 500 nm, teñidos con azul de toluidina, y se observaron al microscopio óptico para confirmar el correcto tratamiento de las muestras.

2.2.3 Análisis de muestras cualitativas

2.2.3.1 Microscopía óptica

Para conocer la composición fitoplanctónica de las muestras se observaron preparados de material vivo y fijados tratados con H₂O₂ o sin tratar, utilizando un microscopio óptico Leica DM 2500 equipado con contraste de fases y con una cámara digital Leica DFC 420 y un microscopio óptico invertido Zeiss Axiovert 40 CFL equipado con contraste de fases y una cámara digital AxioCam 208c.

La identificación de los organismos fue realizada consultando bibliografía general especializada según el grupo fitoplanctónico de pertenencia (Round *et al.*, 1990; Tomas, 1997; Throndsen *et al.*, 2007; Komárek, 2013) y bibliografía más específica dentro de cada grupo (enunciada en los siguientes capítulos).

2.2.3.2 Microscopía electrónica de barrido

El análisis ultraestructural superficial interno y externo de especímenes de las muestras se realizó utilizando microscopios electrónicos de barrido Carl Zeiss NTS SUPRA 40 (Centro de Microscopía Avanzada, Universidad de Buenos Aires), Carl Zeiss GeminiSEM 360 (Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido del Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia) y Carl Zeiss Cross-Beam Auriga (Unidad de Microscopía Electrónica, Universidad Austral de Chile) (Fig. 2.3F).

Una vez fotografiados los organismos de interés, se tomaron medidas celulares utilizando el software ImageJ (Schneider *et al.*, 2012).

2.2.3.3 Microscopía electrónica de transmisión

El análisis ultraestructural de componentes intracelulares de especímenes se realizó utilizando un microscopio electrónico de transmisión Zeiss LIBRA 120 TEM a una aceleración de voltaje de 120 kV y con un spot size de 3.2 nm (Unidad de Microscopía Electrónica, Universidad Austral de Chile).

2.2.4 Análisis de muestras cuantitativas

Los conteos celulares se realizaron siguiendo la metodología de Utermöhl (1958) y Lund *et al.* (1958) utilizando un microscopio invertido Zeiss Axiovert 40 CFL. Las muestras se dejaron reposar durante 24 h en cámaras de 5 ml, un volumen adecuado para la cantidad de sedimentos que presentan (Gómez *et al.*, 2004) (Fig. 2.3G). La cámara completa se cuantificó en 200X y se cuantificaron transectas de 2 y 1 cm de largo en 400X y 1000X, respectivamente. Cada célula fue contada como una unidad y el límite de detección fue de 3 μm aproximadamente. La identificación de organismos se hizo a nivel de especie o género siempre que fue posible y, de no serlo, se agruparon en cianobacterias, clorofíceas, cocales no identificados, diatomeas, dictiocofíceas, dinoflagelados, euglenofíceas, fitoflagelados, prasinofíceas, primnesiofíceas o rafidofíceas.

Además de la cuantificación, se realizaron mediciones de cada célula utilizando un micrómetro ocular. El biovolumen celular se calculó por aproximación a formas geométricas similares morfológicamente, siguiendo los criterios planteados por Hillebrand *et al.* (1999) y Sun & Liu (2003). El contenido de carbono celular se calculó con dos proporciones diferentes de carbono a volumen, una para diatomeas y otra para el resto de los grupos fitoplanctónicos (Menden-Deuer & Lessard, 2000).

En esta tesis la abundancia celular se encuentra expresada en cél. l^{-1} (células por litro) o cél. ml^{-1} (células por mililitro) y la biomasa en $\mu\text{g C l}^{-1}$ (microgramos de carbono por litro).



Fig. 2.3. Fotografías de metodología del análisis de muestras. **A**, observación en microscopio invertido. **B**, micropipeta y portaobjetos excavados utilizados para aislar especímenes. **C**, observación de cultivos al microscopio. **D**, cultivos mantenidos en el laboratorio de cultivos de la División Ficología (FCNyM). **E**, toma de alícuotas para comenzar la realización de preparados fijos. **F**, observación de muestras en el microscopio electrónico de barrido de la Universidad Austral de Chile. **G**, cubeta y contador utilizados para cuantificar fitoplancton.

2.3 – Análisis moleculares

Los análisis moleculares fueron realizados en el Centro de Estudios de Algas Nocivas (CREAN) del Instituto de Fomento Pesquero (IFOP) en Puerto Montt, Chile, a partir de cultivos. Se tomaron alícuotas de los mismos en fase exponencial de crecimiento y se colocaron en tubos Falcon de 15 ml que fueron centrifugados a 3000 rpm. Se descartó el sobrenadante y los pellets se colocaron en tubos Eppendorf de 1,5 ml que se dejaron a -80 °C durante 20 min. Posteriormente, las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente y se procedió a la lisis celular mediante sonicación. La extracción de ADN fue realizada utilizando el kit Plan Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez extraído el ADN, se cuantificó para determinar si había una cantidad suficiente para la amplificación. Para esto se utilizó el kit Qubit™ 1x dsDNA HS Assay Kit

(Thermo Fisher Scientific) y una vez cuantificado, se procedió a su amplificación. La región de interés, la subunidad grande LSU (D1-D2) del ADN ribosómico (rADN), se amplificó utilizando los primers D1R y D2C (Scholin *et al.*, 1994; Edvardsen *et al.*, 2003). El protocolo de PCR incluyó un paso inicial de desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguido de 40 ciclos que consistieron en desnaturalización a 95 °C durante 1 min, unión de primers a 55 °C durante 1:20 min, síntesis de ADN a 72 °C durante 2 min, y un último ciclo de extensión a 72 °C por 10 min. Los productos de la PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % y fueron enviados a MacroGen Sequencing Facility (MacroGen®, Seúl, Corea del Sur) para su secuenciación.

El análisis filogenético se realizó alineando aproximadamente 700 pb (se detalla en cada capítulo) con secuencias disponibles en GenBank, utilizando el alineamiento múltiple ClustalX (Larkin *et al.*, 2007). La reconstrucción filogenética se efectuó mediante el método de máxima verosimilitud (ML) y el modelo Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993) en el software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). Los mejores modelos evolutivos para ML fueron estimados utilizando la herramienta de selección de modelos del mismo software. La confiabilidad de los nodos se estimó utilizando análisis de Bootstrap (1000 réplicas).

Además, se llevaron a cabo análisis de inferencia bayesiana (IB) muestreando en el espacio del modelo general reversible en el tiempo (GTR) con el software MrBayes V3.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). La distancia genética media neta (distancia-*p*) entre las cepas estudiadas y el resto de los clados se calculó utilizando MEGA X. No se aplicaron correcciones para sustituciones múltiples en el mismo sitio, sesgos en la tasa de sustitución (por ejemplo, diferencias entre las tasas de transición y transversión), ni para diferencias en las tasas evolutivas entre los sitios (Nei & Kumar, 2000).

La secuencia utilizada para enraizar los árboles de LSU rADN varió según la especie estudiada y se describe en los correspondientes capítulos.

2.4 – Análisis de pigmentos

Los análisis de pigmentos se realizaron en el Centro de Estudios de Algas Nocivas (CREAN) del Instituto de Fomento Pesquero (IFOP) en Puerto Montt, Chile, a partir de cultivos. Para estudiar la composición pigmentaria de las especies de interés, se

recolectaron alícuotas de 40 ml de cultivo en fase de crecimiento exponencial, que se colocaron en tubos Falcon de 15 ml y se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 min. Los pellets fueron sonicados durante 60 s y se dejaron reposar durante 24 h a -20 °C. Posteriormente, los pigmentos se extrajeron en 1 ml de acetona 90%, a la que se agregaron 0,9 g de matriz lizante D (MP Biomedicals). Las muestras se homogeneizaron durante 45 s en un disruptor de células Minibead Beater-16 (Biospect Products). Después de la homogeneización, las muestras se centrifugaron a 12100 g durante 15 min en una Minispin (Eppendorf). Finalmente, el sobrenadante fue filtrado en viales de HPLC de 1,8 ml mediante filtros de jeringa PVDF de 0,22 µm de poro y 3 mm de diámetro.

Los pigmentos fotosintéticos se analizaron mediante cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento (HPLC) (Shimadzu), equipada con una bomba cuaternaria LC-10AT, un muestreador automático Sil-10AF, un desgasificador DGU-14A y un controlador de sistema CBM-20A, siguiendo el protocolo descrito por Sanz *et al.* (2015).

La separación cromatográfica se realizó utilizando una columna ACE C18 PFP de 150 x 4,6 mm con un tamaño de poro de 3 µm (Advanced Chromatography Technologies) a 40 °C. La fase móvil B fue preparada con etanol, y la fase móvil A consistió en una mezcla de metanol y acetato de amonio 225 mM (82:12 v/v). El gradiente se programó a una velocidad de flujo de 1,0 ml min⁻¹. Los estándares de referencia certificados para aloxantina, anteraxantina, clorofila-*a*, clorofila-*c2*, clorofila-*c1*, fucoxantina, peridina, violaxantina, zeaxantina y β-caroteno se obtuvieron de DHI (DHI Laboratory Products). El acetato de amonio, el etanol y el metanol utilizados fueron de grado HPLC (Merck).

2.5 – Experimentos

2.5.1 Tasas de crecimiento

Los experimentos se realizaron por triplicado en frascos Erlenmeyer con 50 ml de agua de mar enriquecida con medio Guillard f/2. Las cepas fueron aclimatadas a las diferentes condiciones de temperatura (15 °C y 18 °C) y de salinidad (20, 25, 30) durante al menos 3 generaciones (Wood *et al.*, 2005). Estos rangos de temperatura y salinidad se eligieron porque son frecuentemente medidos en la región estuarina. Una vez iniciados los

experimentos, el número de células por ml fue cuantificado cada 72 h durante 28 días utilizando una cámara Sedgewick-Rafter. El promedio del número de células de las tres réplicas fue utilizado para estimar la tasa de crecimiento μ (d^{-1}) siguiendo la fórmula:

$$\mu = \frac{\ln(c_1/c_0)}{t_1 - t_0}$$

en donde c_0 y c_1 son las concentraciones celulares (cél. ml^{-1}) al principio (t_0) y al final (t_1) del período de incubación (días), respectivamente.

2.5.2 Ensayos de citotoxicidad con líneas celulares

Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo en el Centro de Estudios de Algas Nocivas (CREAN) del Instituto de Fomento Pesquero (IFOP) en Puerto Montt, Chile, a partir de cultivos.

2.5.2.1 Cultivo y mantenimiento de líneas celulares RTgill–W1

Las líneas celulares RTgill–W1 (Bols *et al.*, 1994), derivadas de tejido epitelial branquial de trucha arcoíris (*Onchorynchus mykiss*), fueron obtenidas del American Type Culture Collection (CRL-2523, ATCC, Manassas, VA, USA). Las células se cultivaron en frascos de cultivo celular de 25 cm^2 con medio L-15 de Leibovitz (L1518, Sigma) suplementado con 10% (v/v) de serum fetal bovino (FBS, 12003C, Sigma) y una solución antimicótica y antibiótica (A5955, Sigma) con penicilina (10000 unidades ml^{-1}), estreptomycin (10 $mg\ ml^{-1}$) y anfotericina B (25 $\mu g\ ml^{-1}$).

Los cultivos fueron incubados a 19 °C en oscuridad. Las RTgill–W1 crecen formando una monocapa adherida al fondo del frasco, por lo que se utilizó TrypLE™ Express (Gibco™) junto con medio L-15 en una relación 1:2 v/v para despegar las células a fin de repicarlas en nuevos frascos. Generalmente los repiques se realizaron dos veces por semana.

2.5.2.2 Experimentos de viabilidad celular

Los experimentos de viabilidad celular se realizaron en microplacas de cultivo de 96 pocillos de acuerdo con la metodología utilizada por Dorantes-Aranda *et al.* (2011). Las RTgill–W1 fueron despegadas utilizando TrypLE™ Express, cuantificadas con un hemocitómetro y ajustadas a una concentración de 2×10^5 células ml^{-1} . Posteriormente, se sembraron 100 μl de la suspensión (medio L-15 y TrypLE Express™ relación 1:2 v/v,

explicada en la sección anterior) por pocillo y la placa se incubó a 19 °C en oscuridad durante 48 h para que se vuelva a formar la monocapa en el fondo. La primera columna de pocillos se dejó sin sembrar a fin de medir la fluorescencia de la microplaca (blanco). A las 48 h, se descartó el medio de cultivo L-15 y se lavaron las líneas con 120 µl de solución buffer salina (PBS) por pocillo. Una vez finalizado el lavado, las líneas se expusieron a los tratamientos experimentales de las cepas elegidas.

Para los tratamientos experimentales, las cepas microalgales fueron cultivadas en las condiciones descritas en la sección 2.2.1. Durante la fase de crecimiento exponencial, se tomaron 10 ml de cultivo y se colocaron en tubos Falcon. Un ml se fijó con glutaraldehído al 2% y se cuantificó usando una cámara Sedgewick-Rafter o Neubauer, dependiendo del tamaño de la microalga. La muestra fue diluida en serie agregando medio de cultivo para obtener cuatro o cinco concentraciones, según la densidad original del cultivo (Fig. 2.4).

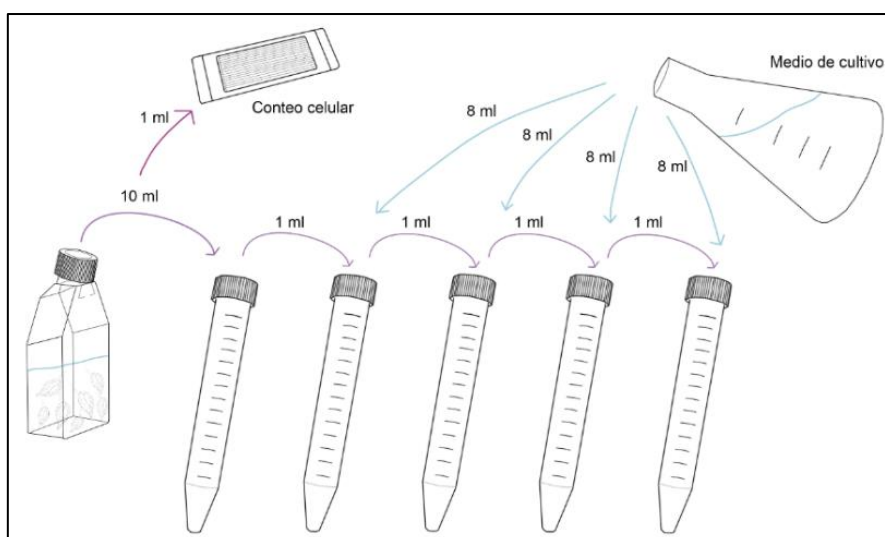


Fig. 2.4. Esquema de las diluciones seriadas a partir de un cultivo de microalgas en crecimiento exponencial.

Para el tratamiento sobrenadante, las microalgas en todas las concentraciones se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min y el sobrenadante fue filtrado con filtros jeringa PVDF de 0,22 µm de poro. Para el tratamiento intracelular, el pellet fue sonificado durante 2 min a 17 °C. Posteriormente, se resuspendió en medio L-15/ex, una versión modificada del L-15 que no contiene serum fetal bovino, y se filtró con filtros de jeringa de 0,22 µm. Una vez finalizada la preparación de los tratamientos, se sembraron en

todas sus concentraciones por cuadruplicado, adicionando 100 µl por pocillo (Fig. 2.5). Las líneas celulares fueron expuestas a los tratamientos durante 2 h a 19 °C en oscuridad.

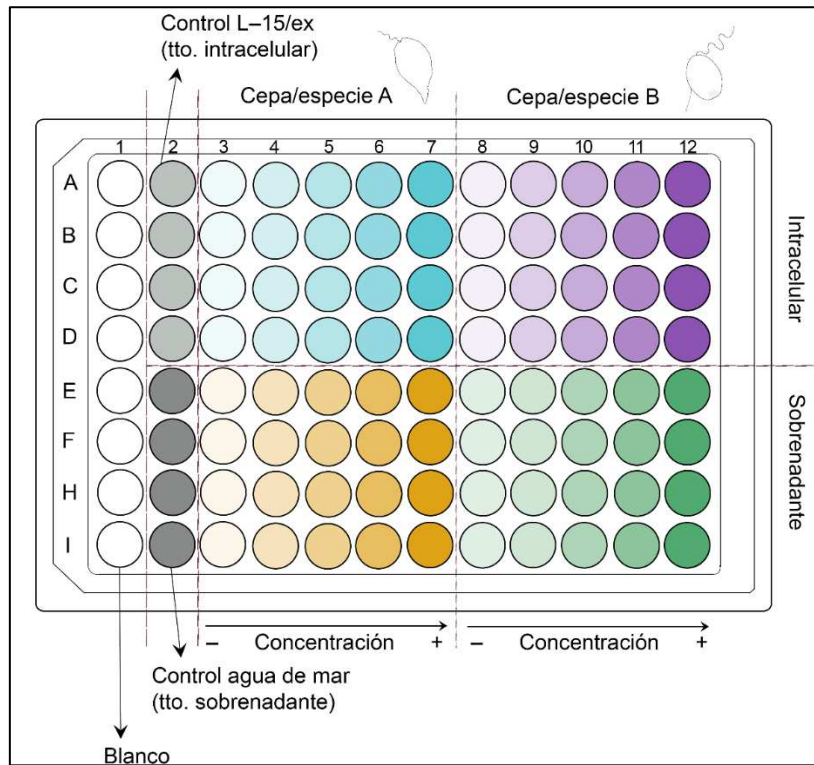


Fig. 2.5. Esquema del diseño experimental utilizado para medir la viabilidad de las líneas celulares RTgill–W1 expuestas a microalgas ictiotóxicas utilizando dos tratamientos (intracelular y sobrenadante) en 5 concentraciones. La primera columna se deja como blanco para el control de la fluorescencia. Las líneas celulares se siembran desde la segunda hasta la última columna en todos los pocillos. La columna 2 se utiliza para controles por cuadruplicado: para el tratamiento intracelular se utiliza como control medio L–15/ex (gris claro) y para el tratamiento sobrenadante se utiliza agua de mar con medio de cultivo (gris oscuro). Los tratamientos se siembran por cuadruplicado desde la columna 3 hasta la última, cada color indica un tratamiento o especie diferente, y cada tonalidad de un mismo color una concentración diferente.

Para medir la viabilidad, se descartaron los tratamientos y se colocaron 100 µl de PBS modificado por el agregado del indicador fluorescente alamarBlue (DAL1025, Invitrogen) a una concentración de 5% en cada pocillo (incluido el blanco) (Page *et al.*, 1993). La microplaca se incubó durante 1 h en oscuridad a 19 °C y la fluorescencia se midió en una lectora de microplacas (FLUOstar Omega, BMG Labtech 415-2871) a partir de la excitación y emisión de filtros de 540 y 590 nm, respectivamente. La viabilidad de las RTgill–W1 se expresa como el porcentaje de respuesta de los tratamientos respecto al control (% del control).

2.6 – Producción de anión superóxido

La producción de anión superóxido (O_2^-) fue analizada en el Centro de Estudios de Algas Nocivas (CREAN) del Instituto de Fomento Pesquero (IFOP) en Puerto Montt, Chile, de acuerdo con la metodología propuesta por Godrant *et al.* (2009), en dos tratamientos: sobrenadante e intracelular. Para el tratamiento sobrenadante los cultivos fueron centrifugados a 3500 rpm durante 10 min y el sobrenadante fue filtrado con filtros jeringa PVDF de 0,22 μm de poro. Para el tratamiento intracelular, el pellet obtenido fue sonicado durante 2 min a 17 °C. Posteriormente, se tomaron 270 μl de cada tratamiento y se sembraron en pocillos por triplicado. A cada pocillo se le añadieron 3 μl de xantina (5mM, X7375, Sigma). Para la corrección del blanco, se colocaron 3 μl de superóxido dismutasa (5 kU l^{-1} , S7571, Sigma) en la primera columna de pocillos (control). Se generó una curva estándar utilizando soluciones de xantina oxidasa (X1875, Sigma) en tres concentraciones (0,1, 0,4 y 0,7 U l^{-1}), colocadas por triplicado desde la segunda hasta la cuarta columna de pocillos.

Finalmente, para la detección del O_2^- , se añadieron 5 μl de 125 μM MCLA, 6-(4-metoxifenil)-2-metil-3,7-dihidroimidazo[1,2-a]pirazin-3(7H)-ona clorhidrato (87787, Sigma) a todos los pocillos. La luminiscencia fue monitoreada durante 20 min utilizando una lectora de microplacas (FLUOstar Omega, BMG Labtech 415-2871).

2.7 – Extracción y análisis de toxinas PST

La producción de toxinas paralizantes de moluscos (PST) fue analizada en el Centro de Estudios de Algas Nocivas (CREAN) del Instituto de Fomento Pesquero (IFOP) en Puerto Montt, Chile. Se colectaron alícuotas de 15 ml de cultivo en fase exponencial, de las cuales 2 ml se fijaron para determinar la densidad celular utilizando una cámara Sedgewick-Rafter. El resto fue centrifugado y filtrado a través de filtros de fibra de vidrio de 25 mm de diámetro (Whatman™ GF/C, 1,2 mm de tamaño de poro) y los filtros se colocaron en tubos plásticos de 2 ml. A cada tubo se le añadieron 0,5 ml de ácido acético (0,05 M) y aproximadamente 0,9 g de matriz de lisis D (MP Biomedicals, EE. UU.). Los tubos fueron homogeneizados durante 45 s en un disruptor de células Minibead Beater-16 (Biospect Products) y centrifugados durante 5 min utilizando una Minispin (Eppendorf) a 12100 g. El sobrenadante fue filtrado a través de filtros de jeringa PVDF

de 0,22 μm de poro y 3 mm de diámetro. Luego, se diluyeron alícuotas de 200 μl del sobrenadante con 600 μl acetonitrilo y se transfirieron a viales para HPLC, almacenándose a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

La separación cromatográfica se realizó utilizando un sistema de cromatografía de ultra-alto rendimiento acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo Agilent 6420A con fuente ESI (Agilent, Palo Alto, CA, EE. UU.), siguiendo la metodología propuesta por Rodríguez *et al.* (2018). Las toxinas PST se separaron utilizando una columna UHPLC BEH amida Acquity (100 x 2,1 mm, 1,7 μm , Waters) a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ con un volumen de inyección de 5 μl . La fase móvil A fue 100% agua con 0,1% de ácido fórmico y 10 mM de formiato de amonio. La fase móvil B fue de MeCN con 0,1% de ácido fórmico y 2% de 100 mM de formiato de amonio disuelto en agua. La separación se realizó utilizando un método de gradiente a 0,4 ml/min, comenzando con un 9% de B, seguido por un gradiente lineal hasta el 21% de B en 7 min. Se aplicó un gradiente lineal para retornar a las condiciones iniciales en 0,1 min. El tiempo total fue de 13,5 min.

Los análisis espectrométricos de masas para los análogos de GC se realizaron mediante la adición de transiciones GC, de acuerdo con Durán-Riveroll *et al.* (2017). Las soluciones estándar certificadas para las toxinas PST (C1 y C2, GTX1 y GTX4, GTX2 y GTX3, GTX5 (anteriormente B1), GTX6 (anteriormente B2), dcGTX2 y dcGTX3, dcSTX, STX, dcNEO, NEO) fueron obtenidas del National Research Council Canada (NRCC, Halifax, Canadá).

2.8 – Análisis estadísticos, mapas y figuras

Todos los análisis estadísticos de esta tesis fueron realizados con los softwares R, interfaz RStudio (R Core Team, 2022) y Jamovi (The Jamovi Project, 2023). Los paquetes estadísticos utilizados en cada caso se detallan en la metodología de cada capítulo.

Los mapas fueron realizados con el software QGIS (www.qgis.org) usando como mapa base ESRI Ocean. Los mapas de distribución superficial de temperatura y salinidad del agua fueron realizados con el software Ocean Data View seleccionando la opción DIVA gridding (ODV, www.odv.awi.de).

Todas las figuras y esquemas de esta tesis se realizaron con los programas Adobe Photoshop 2021 o Inkscape 1.2.2 (www.inkscape.org).

Capítulo 3

Composición y dinámica espacio–temporal del fitoplancton

3.1 – Introducción

Los ambientes estuarinos cumplen un papel fundamental en la reproducción de peces actuando como zonas de cría (Norcross & Shaw, 1984; Allen & Barker, 1990; Beck *et al.*, 2001; Day *et al.*, 2013). Estos entornos ofrecen varias ventajas: 1) alta producción biológica que garantiza alimento para las larvas; 2) temperaturas elevadas en las áreas someras que promueven un desarrollo embrionario rápido (Miller *et al.*, 1985; Day *et al.*, 2013); 3) refugio proporcionado por la turbidez, disminuyendo la probabilidad de detección por parte de depredadores; y 4) patrones de circulación en los estuarios estratificados debido al ingreso de agua marina al interior por el fondo, mientras que el río fluye por la superficie hacia el exterior (Acha *et al.*, 2015), permitiendo que las larvas desovadas fuera del estuario ingresen al mismo.

La corvina rubia (*Micropogonias furnieri*, Sciaenidae) es una especie eurihalina, bentónica y costera que domina en abundancia en el estuario del Río de la Plata (Braverman *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2024). Esta región representa su principal zona de reproducción (Acha *et al.*, 1999; Macchi *et al.*, 2003), y la bahía Samborombón y el Río Santa Lucía son las principales áreas de cría y desove (Mianzan *et al.*, 2001; Braverman *et al.*, 2009; Vera Sierra, 2011). Su principal alimento es el zooplancton (Vera Sierra, 2011; Alves *et al.*, 2024), que controla al fitoplancton por pastoreo (Harris *et al.*, 2000). Las microalgas representan el primer eslabón de las tramas tróficas en cualquier ambiente acuático, por lo que conocer la biomasa en términos de carbono de los organismos fitoplanctónicos es esencial para entender procesos ecosistémicos (Menden-Deuer & Lessard, 2000).

En el estuario del Río de la Plata el frente de salinidad produce la resuspensión de sedimentos, generando un frente de turbidez que sigue la geometría de la bahía Samborombón (Ver sección 1.4, Capítulo 1). Además de sedimentos, el río y sus tributarios aportan grandes cantidades de nutrientes, que se concentran mayormente en la zona dulceacuícola (Carreto *et al.*, 1986; Gómez *et al.*, 2004; Licursi *et al.*, 2006). La concentración de clorofila en la capa superficial y la biomasa son mayores en la zona

estuarina que en la dulceacuícola debido a la disminución de la turbidez (Carreto *et al.*, 1986; Gómez *et al.*, 2004). Carreto *et al.* (1986) determinaron un alto consumo de nutrientes y una notable disminución de la clorofila a medida que aumenta la profundidad. Esto se debe a que en aguas donde los nutrientes no representan un factor limitante, la disponibilidad de luz se convierte en un factor crítico para la producción primaria (Negri *et al.*, 1988; Méndez *et al.*, 1997; Calliari *et al.*, 2005).

Las asociaciones fitoplanctónicas responsables de los altos valores de clorofila encontrados en la costa y el eje fluvio-estuarino del estuario fueron estudiadas principalmente en primavera por Negri *et al.* (1988), Carreto *et al.* (2003), Gómez *et al.* (2004) y Licursi *et al.* (2006), y en primavera y otoño por García & Bonel (2014). Negri *et al.* (1988) no encontraron asociaciones fitoplanctónicas claras para la región estuarial pero pudieron distinguir una dominancia de diatomeas, dinoflagelados tecados y silicoflagelados. Por su parte, Carreto *et al.* (2003) encontraron que las diatomeas eran dominantes en las áreas estuariales y costeras, acompañadas por criptofíceas, prasinofíceas y dinoflagelados.

Gómez *et al.* (2004) estudiaron la estructura y composición de primavera de las regiones dulceacuícola y mixohalina del Río de la Plata, así como en el sector más externo de la bahía Samborombón. La región estuarina se caracterizó por una dominancia de diatomeas y dinoflagelados, y el aporte de carbono fue al menos tres veces mayor que en la región dulceacuícola, sugiriendo que las condiciones para el crecimiento fitoplanctónico mejoran al incrementar la salinidad (Calliari *et al.*, 2005).

Licursi *et al.* (2006) realizaron un estudio similar centrado en las diatomeas de las mismas regiones estudiadas por Gómez *et al.* (2004). Ambos trabajos coincidieron en que la región dulceacuícola estaba dominada por clorofíceas, seguidas por diatomeas y cianobacterias, mientras que la región estuarina estaba dominada por diatomeas y dinoflagelados, y presentaba mayores valores de biomasa. Carreto *et al.* (2008) describieron una estructura similar, detectando que los ensambles río arriba estaban dominados por clorofíceas, diatomeas, cianobacterias y criptofíceas, mientras que en la región estuarina predominaban diatomeas, dinoflagelados y en menor proporción, criptofíceas, silicoflagelados, cianobacterias, euglenofíceas y prasinofíceas.

Finalmente, García & Bonel (2014) realizaron un estudio integral de las comunidades planctónicas a lo largo de la costa dulceacuícola del estuario. En relación

con el fitoplancton encontraron valores elevados de densidad y biomasa cerca de la desembocadura del río. Identificaron una dominancia de diatomeas, que aportaban la mayor cantidad de carbono cerca de la región estuarina, seguidas por clorofíceas, euglenofíceas y cianobacterias, cuya biomasa se concentraba en la región dulceacuícola.

A pesar de que los estudios anteriores han examinado la variabilidad espacial del fitoplancton a lo largo del estuario del Río de la Plata, estos se han enfocado principalmente en la desembocadura del río y la plataforma continental, sin incluir un muestreo exhaustivo en la bahía Samborombón, un área clave para la cría de juveniles de peces de alto valor económico como la corvina rubia. Además, la variabilidad temporal del fitoplancton permanece poco explorada, dado que la mayoría de los estudios se han realizado en campañas de primavera. Por lo tanto, el objetivo principal de este capítulo es describir la composición y dinámica espacio-temporal de la densidad y biomasa del fitoplancton de la bahía Samborombón, y analizar los factores que influyen en la variación de su estructura, con énfasis en la temperatura y salinidad, bajo la hipótesis de que la abundancia y biomasa varían en respuesta a cambios estacionales, siendo más elevadas en estaciones cálidas, y que su estructura presenta diferencias espaciales influenciadas por el gradiente de salinidad.

3.2 – Metodología

Del total de 148 muestras cuantitativas y cualitativas analizadas en este estudio, 66 fueron colectadas a bordo de las embarcaciones *Willie* y *Bernie* del INIDEP entre los años 2016 y 2018 (en adelante, campañas realizadas desde embarcaciones). Estas muestras se obtuvieron en el área comprendida entre la costa y las 7 millas náuticas (Fig. 3.1A,B), incluyendo los canales tributarios de la bahía Samborombón (ver sección 2.1.1 del Capítulo 2). De estas, 34 fueron colectadas en primavera/verano y 32 en otoño/invierno. Se codificaron longitudinalmente en canales, línea de costa y siete millas, y latitudinalmente en norte, centro y sur (Fig. 3.1A,B).

Las 82 muestras restantes fueron colectadas desde la costa entre los años 2019 y 2021 (ver sección 2.1.2 del Capítulo 2) (Fig. 3.1A,B), distribuyéndose estacionalmente en 31 de primavera, 20 de verano, 15 de otoño y 16 de invierno.

La codificación de las 148 muestras, junto con la fecha de muestreo, ubicación geográfica, y códigos estacionales se detallan en el Anexo 1 (campañas realizadas desde embarcaciones) y Anexo 2 (campañas realizadas desde la costa), ambos contenidos en el Capítulo 9.

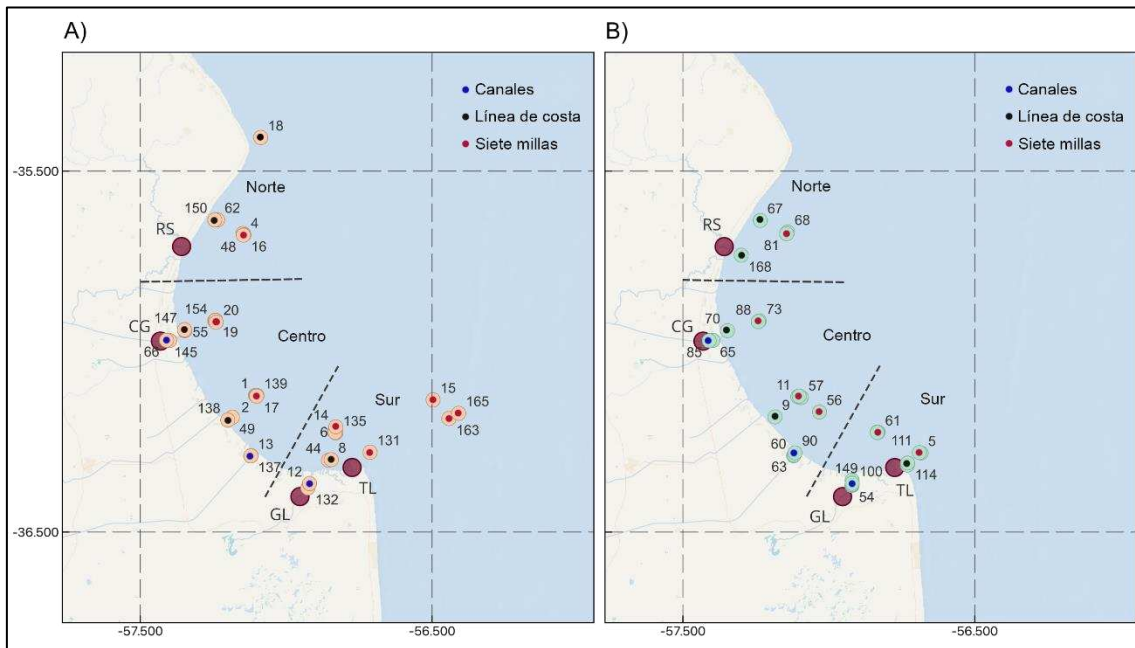


Fig. 3.1. Sitios de muestreo de las campañas realizadas desde embarcaciones en **A**, primavera/verano círculos amarillos y **B**, otoño/invierno círculos celestes. Las muestras o grupos de muestras se clasificaron en forma longitudinal como canales (puntos azules), línea de costa (puntos negros) y siete millas (puntos rojos), y de forma latitudinal (líneas punteadas) en Norte, Centro y Sur. Se indican además los sitios de muestreo de las campañas realizadas desde la costa (círculos bordó). Referencias, TL, Tapera de López; GL, General Lavalle; CG, Cerro de la Gloria; RS, Río Samborombón.

El procesamiento de cada muestra fue llevado a cabo siguiendo la metodología descrita en las secciones 2.2.2 y 2.6 del Capítulo 2.

Para los análisis estadísticos de las variables ambientales de ambos muestreos (temperatura, salinidad, pH, oxígeno disuelto, turbidez, dirección del viento, velocidad del viento y marea; ver secciones 2.1.1 y 2.1.2 del Capítulo 2) se realizaron correlaciones de Pearson y Spearman utilizando la función *cor* del paquete *stats* (R Core Team, 2022) y pruebas de Kruskal-Wallis para discriminar diferencias entre pares de medias mediante la función *kruskal.test* del mismo paquete. Para analizar la relación entre las variables respuesta y las ambientales, se usaron los datos de abundancia y biomasa de las muestras obtenidas desde la costa. Para esto, se consideraron las especies que

presentaron un porcentaje de ocurrencia mayor al 15%. En primer lugar, se realizó un análisis de correspondencia sin tendencia (DCA, por sus siglas en inglés) preliminar (ter Braak, 1989) con la función *decorana* del paquete *vegan* (Oksanen, 2015) para confirmar que la longitud del gradiente en unidades de desviación estándar era <4. Posteriormente, se realizaron dos análisis de redundancia (RDA) mediante la función *rda* del paquete *vegan*, usando como variables explicativas la salinidad, temperatura, turbidez, dirección del viento, velocidad del viento, pH, oxígeno disuelto y marea. Estas variables fueron previamente normalizadas utilizando la función *decostand* del paquete *vegan*. Los dos conjuntos de datos de variables respuesta (abundancia y biomasa) fueron transformados mediante el método de Hellinger (Legendre & Gallagher, 2001) utilizando la función *decostand* del paquete *vegan* antes de realizar el RDA. El primer RDA incluyó sólo el intercepto de todas las variables explicatorias y el segundo incluyó todas las variables explicatorias. A continuación, se seleccionó el modelo final que incluía variables significativas o marginalmente significativas (considerándose marginalmente significativos aquellos valores de $p < 0,05$), usando la función *ordistep* (Blanchet *et al.*, 2008) del paquete *vegan*. La significancia del modelo se testeó con la función *anova.cca* del mismo paquete (Legendre *et al.*, 2011).

3.3 – Resultados

3.3.1 Campañas realizadas desde embarcaciones (2016 – 2018)

3.3.1.1 Características físicas

La temperatura del agua osciló entre 6,0 °C, el valor mínimo medido en otoño de 2016 en el canal Ría Lavalle (Sitio 54, Fig. 3.1B), y 24,2 °C, el valor más elevado medido en verano del 2017 en el Canal 1 (Sitio 13, Fig. 3.1A). La temperatura promedio durante todo el período de estudio fue de $15,8 \pm 0,6$ °C. El valor promedio más alto se registró en 2017 ($19,1 \pm 0,7$ °C), seguido de 2018 ($15,1 \pm 1,4$ °C) y 2016 ($14,2 \pm 0,8$ °C) (Fig. 3.2A). Naturalmente, los valores más elevados se encontraron generalmente en primavera/verano ($18,3 \pm 0,7$ °C) y los menores en otoño/invierno ($13,0 \pm 0,9$ °C), aunque se observó gran variación estacional (Fig. 3.2B).

A lo largo de la bahía, la temperatura promedio de todo el período estudiado fue más alta en el norte, alcanzando aproximadamente 17 °C, disminuyendo en el centro a

los 15 °C, y volviendo a aumentar hacia el sur, donde los canales aportaron agua más cálida (Fig. 3.3A). Al alejarse de la costa hacia mar abierto, la temperatura superficial aumentó en la región central, excepto en un sitio en que estuvo cercano a los 10 °C (EG 56, Fig. 3.1B), y en el sur a las siete millas, desde donde ascendió hacia el resto del estuario (Fig. 3.3A).

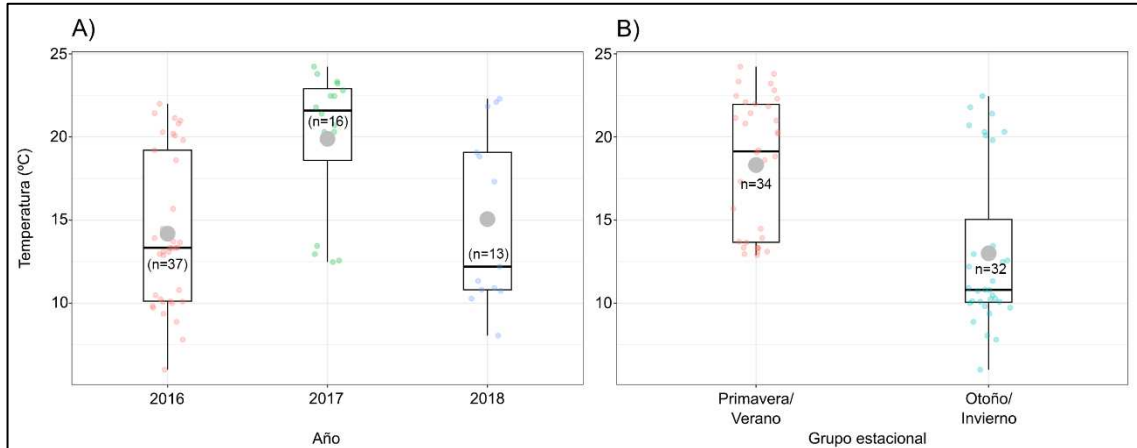


Fig. 3.2. Gráfico de cajas de la temperatura promedio del perfil (°C) por año (A) y por grupo estacional (B). Los círculos grises indican el valor promedio.

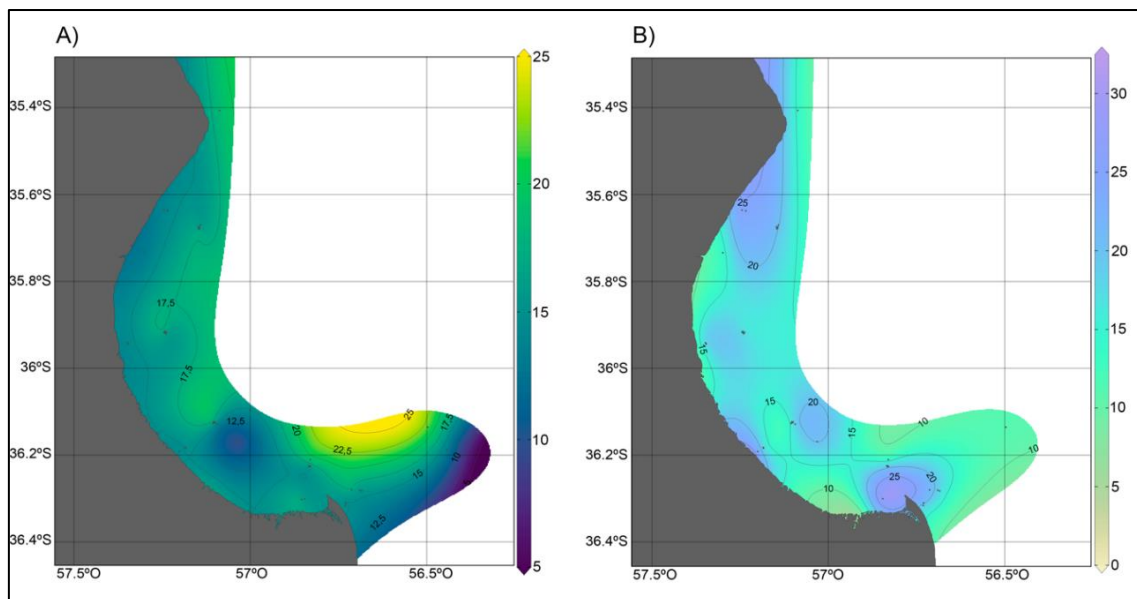


Fig. 3.3. Distribución espacial de la temperatura promedio del perfil (A) y salinidad promedio del perfil (B) durante todo el período estudiado (2016-2018).

La salinidad fluctuó entre 1,1, el valor mínimo medido en invierno del 2017 en el canal Ría Lavalle (Sitio 149, Fig. 3.1B), y 31,9, el máximo medido en primavera del 2016 a las siete millas del Canal 15 (Sitio 154, Fig. 3.1A). El promedio superficial para todo el

período estudiado fue de $17,1 \pm 1,1$. El valor promedio más elevado se observó en 2016 ($20,0 \pm 1,6$), mientras que no hubo grandes diferencias durante 2017 y 2018 ($12,9 \pm 1,0$ y $13,6 \pm 1,9$, respectivamente) (Fig. 3.4A). En cuanto al análisis estacional, el promedio del perfil de salinidad fue mayor en primavera/verano ($18,1 \pm 1,6$) en comparación con otoño/invierno ($15,9 \pm 1,4$) (Fig. 3.4B).

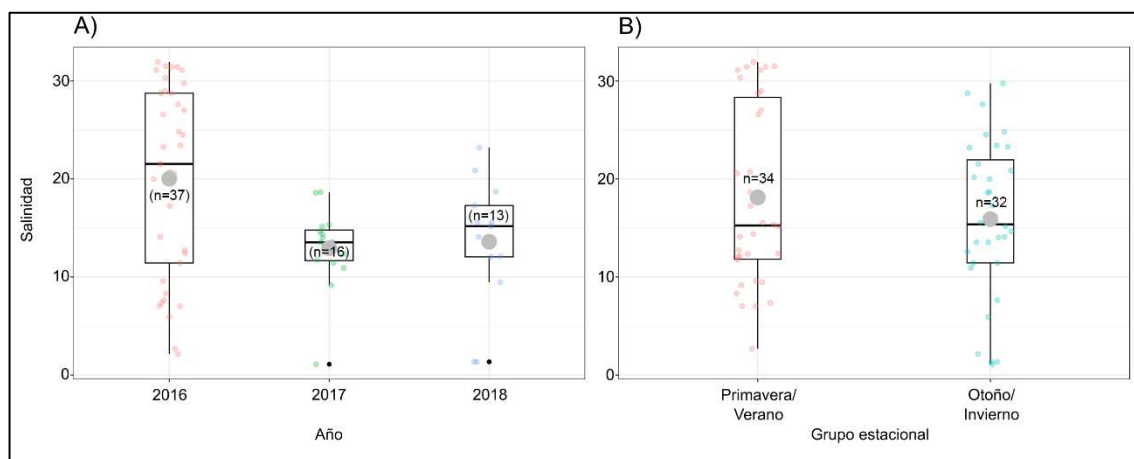


Fig. 3.4. Gráfico de cajas de la salinidad promedio del perfil por año (A) y por grupo estacional (B). Los círculos grises indican el valor promedio.

La distribución de la salinidad superficial en la bahía fue heterogénea, con marcadas fluctuaciones en los sitios estudiados (Fig. 3.3B). Los valores oscilaron entre 15 y 25 en la región norte, disminuyendo en el centro y en la mayoría de los sitios en la región sur, para luego aumentar hacia la punta de la bahía. Aguas adentro, la salinidad mostró una variación similar, con rangos amplios entre 15 y 20, siendo ligeramente menor en algunos sitios, como los cercanos a General Lavalle, donde fue menor a 10.

La salinidad presentó una débil correlación negativa con la temperatura ($-0,33$, $p=0,06$, Pearson) al analizar todas las muestras, y fue más elevada al analizar las muestras espacialmente. Latitudinalmente, el norte mostró una correlación moderada negativa entre salinidad y temperatura ($-0,56$, $p=0,07$, Pearson), que disminuyó en los otros dos grupos de sitios ($-0,32$, $p=0,07$, Pearson para el centro y $-0,30$, $p=0,15$, Pearson para el sur). Longitudinalmente, las siete millas presentaron una correlación negativa de $-0,67$ ($p<0,05$, Pearson), y la línea de costa de $-0,66$ ($p<0,05$, Pearson), mientras que los canales presentaron una correlación positiva débil entre estas variables ($0,29$, $p=0,27$, Pearson).

El caudal promedio del Río de la Plata en el período analizado fue de $27460 \pm 873 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, siendo ligeramente mayor en otoño/invierno ($27664,8 \pm 866,9 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) que en primavera/verano ($27267,6 \pm 1499,9 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$). La correlación entre el caudal y la salinidad fue estadísticamente significativa, débil y negativa para todo el período estudiado ($-0,308$, $p < 0,05$, Pearson). En sentido latitudinal, la correlación fue más alta en el norte ($-0,616$, $p < 0,05$, Pearson). En sentido longitudinal, fue más fuerte en la línea de costa que a las siete millas ($-0,687$, $p < 0,05$, Pearson), mientras que a las siete millas fue más débil ($-0,411$, $p < 0,05$, Pearson).

La turbidez promedio ($n = 38$) fue de $85,0 \pm 23 \text{ NTU}$. En ambos grupos estacionales el promedio fue similar, siendo ligeramente mayor en otoño/invierno (primavera/verano = $83,4 \pm 17,7 \text{ NTU}$, otoño/invierno = $86,7 \pm 45,2 \text{ NTU}$). La región centro presentó el valor promedio de turbidez más alto $99,3 \pm 47,1 \text{ NTU}$, seguido por la región sur ($88,5 \pm 29,3 \text{ NTU}$) y la región norte ($50,2 \pm 28,1 \text{ NTU}$). Los canales fueron los que mostraron la mayor turbidez promedio ($231,2 \pm 97,6 \text{ NTU}$), descendiendo hacia la línea de costa y las siete millas ($73,6 \pm 32,8$ y $40,1 \pm 9,6 \text{ NTU}$, respectivamente).

3.3.1.2 Abundancia, biomasa y composición del fitoplancton. Variación espacio-temporal

La abundancia celular promedio del fitoplancton fue de $1,0 \times 10^6 \text{ células l}^{-1}$ (cél. l^{-1}) y la biomasa promedio fue de $108,3 \mu\text{g}$ de carbono l^{-1} ($\mu\text{g C l}^{-1}$) considerando todas las muestras. El año 2018 presentó la mayor abundancia fitoplanctónica, mientras que los valores más altos de biomasa fueron registrados en el año 2017 (Tabla 3.1). Tanto la abundancia como la biomasa promedio fueron mayores en las muestras de primavera/verano (Tabla 3.2). Sin embargo, la abundancia alcanzó un valor máximo registrado en otoño/invierno (Fig. 3.5, EG 100). Las muestras de otoño/invierno presentaron una abundancia promedio levemente menor y una reducción de la biomasa, cercana al 50% (Tabla 3.2).

Tabla 3.1. Valores promedio y error estándar (EE) de abundancia (cél. l^{-1}) y biomasa ($\mu\text{g C l}^{-1}$) por año.

Año	N	Abundancia ($\times 10^6$) \pm EE	Biomasa \pm EE
2016	37	$0,8 \pm 0,2$	$73,6 \pm 14,1$
2017	16	$1,0 \pm 0,3$	$161,0 \pm 35,4$
2018	13	$1,9 \pm 0,6$	$142,8 \pm 34,8$

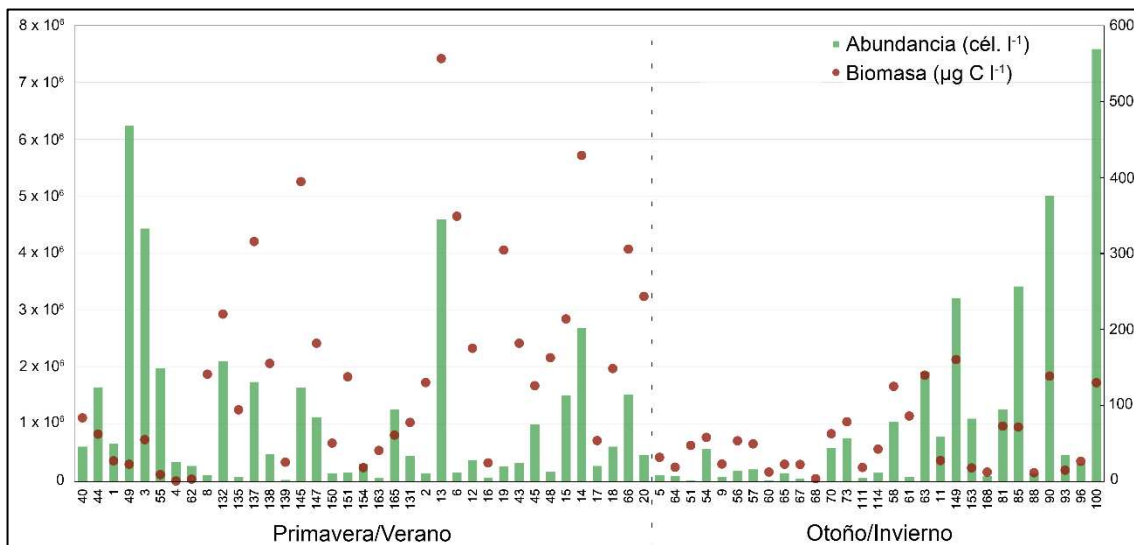


Fig. 3.5. Distribución de la abundancia (barras) y biomasa (puntos) total del fitoplancton por muestra durante todo el período de estudio. Los números 40-100 corresponden a los códigos de las muestras ordenadas cronológicamente según grupo de estación (Anexo 1, Capítulo 9).

En términos de distribución espacial, la abundancia total fue mayor en los canales hacia el centro y sur de la bahía (Fig. 3.6A), mientras que la biomasa total presentó los mayores valores en el centro y en el sur hacia los canales y las siete millas (Fig. 3.6B).

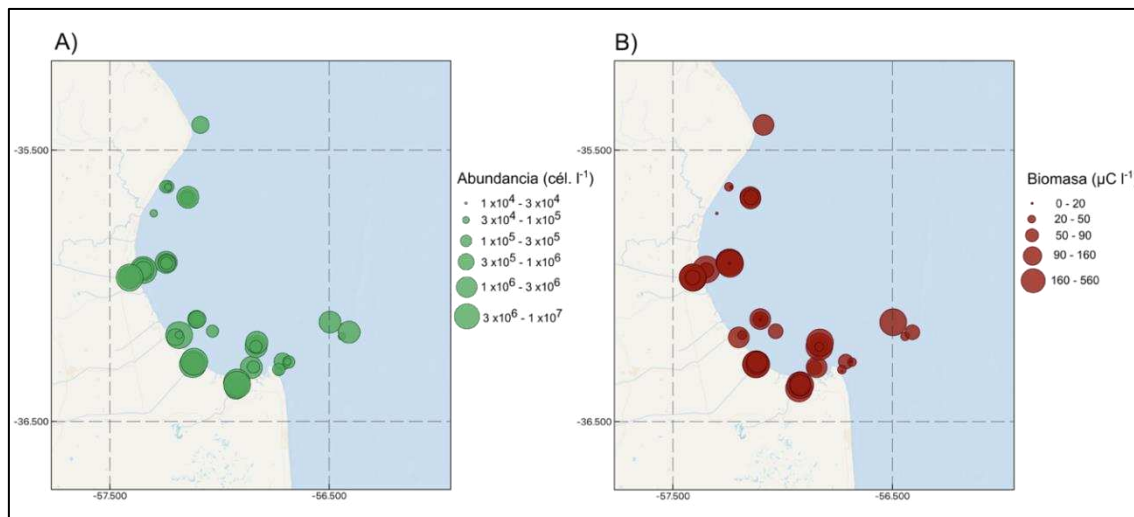


Fig. 3.6. Distribución espacial de la **A**, abundancia total del fitoplancton (cél. l⁻¹) y **B**, biomasa total del fitoplancton (µC l⁻¹) en la bahía Samborombón.

Se identificaron tres agrupamientos principales en la distribución de la abundancia y biomasa en función de la temperatura y salinidad (Fig. 3.7). El primero, con mayor número de muestras y generalmente alta abundancia y biomasa en

primavera/verano, se encontró entre los 16 y 25 °C y entre salinidades de 5 y 22, con una mayor concentración de abundancias entre los 20 y 22 °C y los 10 a 15 de salinidad. El segundo, con un número mayor de muestras de otoño/invierno y bajas abundancias en general, se halló entre los 7,5 a 15 °C y salinidades de 10 y 30. Este grupo puede subdividirse en muestras de otoño/invierno, con baja biomasa, mayormente concentradas a los 10 °C y salinidad alrededor de 20, y muestras de primavera/verano con mayor biomasa en temperaturas y salinidades más altas. El tercer grupo, caracterizado por pocas muestras principalmente de otoño/invierno con altas abundancias, pero con una disminución de la biomasa, se ubicó a bajas temperaturas (entre 7 a 15 °C) y bajas salinidades (2 a 10).

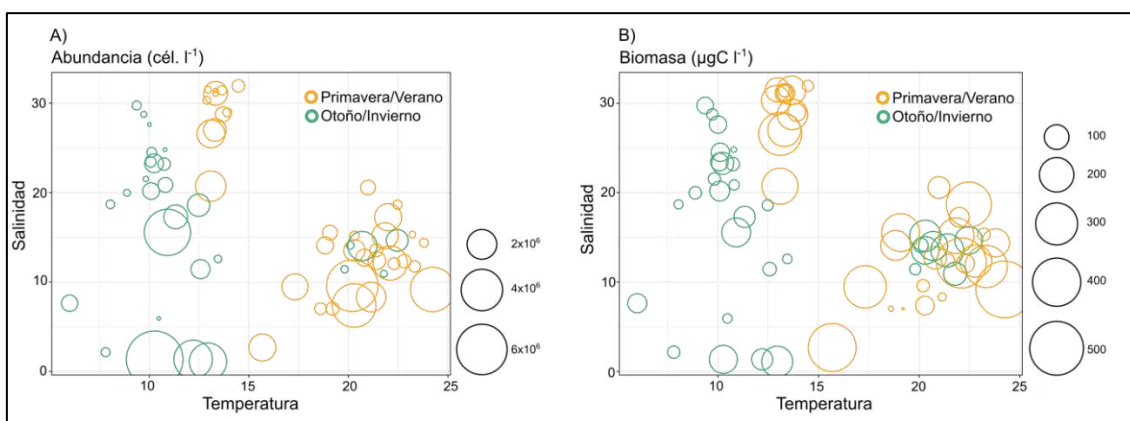


Fig. 3.7. Distribución de la abundancia total del fitoplancton ($\times 10^6$ cél. l⁻¹) y biomasa total del fitoplancton ($\mu\text{C l}^{-1}$) en función de la temperatura (°C) y la salinidad.

En el total de muestras de fitoplancton analizadas se identificaron 183 taxa pertenecientes a 11 grupos taxonómicos. Las diatomeas estuvieron presentes en el 100% de las muestras analizadas, seguidas por los dinoflagelados (88%), clorofíceas (71%), prasinofíceas (70%), cianobacterias (50%) y fitoflagelados (47%). Con una presencia en las muestras menor al 40% se encontraron organismos unicelulares cocales (en adelante, cocales indeterminados), euglenofíceas, rafidofíceas, dictiocofíceas y primnesiofíceas. Fotografías bajo MEB de algunos representantes de los grupos están disponibles en el Anexo 3 (Capítulo 9, Anexos), mientras que el listado de especies y géneros hallados en esta tesis puede consultarse en el Anexo 8 (Capítulo 9, Anexos).

Tabla 3.2. Valores mínimos, máximos, promedio y error estándar de abundancia celular ($\times 10^6$ cél. l⁻¹) y biomasa ($\mu\text{C l}^{-1}$) del fitoplancton y los grupos taxonómicos en la totalidad de las muestras y por grupo

estacional (Prim/Ver, primavera/verano; Ot/Inv, otoño/invierno) encontrados en las campañas realizadas desde embarcaciones. Referencias, Mín., mínimo; Máx., máximo; \bar{X} , promedio; \pm , error estándar; Abun., abundancia; Biom., biomasa; –, no se registraron datos.

		Muestreo total				Prim/Ver				Ot/Inv			
		Mín.	Máx.	\bar{X}	\pm	Mín.	Máx.	\bar{X}	\pm	Mín.	Máx.	\bar{X}	\pm
Total	Abun.	0,01	7,6	1,0	0,2	0,02	6,3	1,1	0,2	0,01	7,6	1,0	0,3
fitoplancton	Biom.	0,3	556,2	108,3	14,2	0,3	556,2	150,0	23,8	3,3	181,7	64,0	9,4
Diatomeas	Abun.	0,001	3,1	0,3	0,06	0,02	3,1	0,5	0,01	0,001	0,9	0,2	0,05
	Biom.	0,3	347,7	68,6	9,5	0,3	347,7	98,7	16,0	1,4	156,0	36,4	6,8
Dinoflagelados	Abun.	–	0,2	0,02	0,005	–	0,2	0,02	0,007	–	0,2	0,02	0,008
	Biom.	–	123,0	9,0	0,4	–	123,0	13,5	4,9	–	50,0	4,3	1,6
Clorofíceas	Abun.	–	2,3	0,5	0,05	–	2,3	0,2	0,08	–	1,0	0,8	0,05
	Biom.	–	217,9	14,8	4,5	–	217,9	18,7	8,2	–	60,0	10,6	3,0
Prasinofíceas	Abun.	–	5,4	0,2	0,1	–	5,4	0,3	0,5	–	1,8	0,2	0,07
	Biom.	–	39,9	2,5	0,9	–	29,8	3,1	1,3	–	39,9	1,7	1,2
Cianobacterias	Abun.	–	2,1	0,1	0,04	–	1,1	0,08	0,4	–	2,1	0,1	0,08
	Biom.	–	141,5	5,1	2,3	–	141,5	7,3	4,4	–	39,0	2,9	1,3
Fitoflagelados	Abun.	–	2,4	0,2	0,06	–	0,2	0,03	0,09	–	2,4	0,3	0,2
	Biom.	–	22,3	2,7	0,7	–	16,9	1,8	0,7	–	22,3	3,7	1,1
Cocales indeterminados	Abun.	–	0,1	0,007	0,003	–	0,1	0,008	0,004	–	0,1	0,004	0,003
	Biom.	–	24,6	1,5	0,5	–	14,0	1,2	0,5	–	24,6	1,9	0,8
Euglenofíceas	Abun.	–	0,1	0,005	0,003	–	0,1	0,005	0,004	–	0,1	0,006	0,005
	Biom.	–	16,6	1,2	0,4	–	16,6	0,7	0,5	–	15,0	1,8	0,6
Rafidofíceas	Abun.	–	0,1	0,005	0,003	–	0,1	0,006	0,004	–	0,1	0,004	0,004
	Biom.	–	62,2	2,9	0,9	–	62,2	5,1	2,5	–	13,6	0,8	0,5
Dictiocofíceas	Abun.	–	0,1	0,009	0,002	–	0,1	0,008	0,004	–	0,1	0,009	0,004
	Biom.	–	2,2	0,07	0,1	–	2,2	0,09	0,1	–	2,0	0,06	0,1
Primnesiofíceas	Abun.	–	0,1	0,008	0,003	–	0,1	0,008	0,004	–	0,1	0,009	0,003
	Biom.	–	2,5	0,1	0,1	–	2,5	0,2	0,1	–	1,1	0,1	0,1

3.3.1.2.1 Diatomeas

Las diatomeas estuvieron presentes en todas las muestras analizadas (Fig. 3.8) y dominaron tanto en abundancia como en biomasa durante todo el año, con un promedio total de $0,3 \times 10^6$ cél. l^{-1} y $68,6 \mu g C l^{-1}$, respectivamente (Tabla 3.2). La abundancia y biomasa fueron mayores en primavera/verano, disminuyendo hacia el otoño/invierno (Tabla 3.2 y Fig. 3.8A,B).

En cuanto a la distribución espacial de la abundancia durante la primavera/verano, las diatomeas generalmente dominaron en las muestras del norte y centro sobre la línea de la costa y las siete millas, mientras que en el sur dominaron en algunas de las muestras de los canales, y en la mayoría de línea de costa y las siete millas (Fig. 3.9A). En otoño/invierno, en el norte no fueron dominantes en general, excepto en la muestra EG67 (Fig. 3.9B). En la región central dominaron en algunas muestras de los canales y las siete millas (Fig. 3.9B). Finalmente, en el sur, dominaron en la mayoría de las muestras de la línea de costa y siete millas (Fig. 3.9B).

La distribución espacial de la biomasa en primavera/verano estuvo dominada por las diatomeas en la mayoría de las muestras, excepto en algunas procedentes de los canales y de la línea de costa (Fig. 3.8B, Fig. 3.9C). En otoño/invierno, el mayor aporte de carbono se encontró en el norte y en el sur, en la línea de costa y las siete millas (Fig. 3.9D). En el centro, en los canales y la línea de costa, y en algunos canales hacia el sur, fueron reemplazadas por otros grupos fitoplanctónicos (Fig. 3.9D).

Dentro de los taxa identificados, los que presentaron la mayor abundancia relativa en las muestras fueron *Actinocyclus octonarius*, *Ceratoneis* spp., *Chaetoceros* spp., *Coscinodiscus perforatus*, *C. radiatus*, *Leptocylindrus minimus*, *Melosira* spp., *Paralia* spp., *Pleurosigma frenguellianum*, *Shionodiscus oestrupii* var. *venrickae*, *Skeletonema tropicum*, *Thalassionema nitzschioides*, *Thalassiosira hendeyi* y *T. nodulolineata*. Mientras que, en términos de biomasa relativa, los taxones dominantes fueron *Actinocyclus octonarius*, *Chaetoceros* spp., *Coscinodiscus* spp., *Melosira* spp., *Thalassiosira* sp., *T. hendeyi* y *T. nodulolineata*.

3.3.1.2.2 Dinoflagelados

Este grupo estuvo presente en el 88% de las muestras, sin embargo, en ninguna fue dominante. En primavera/verano, la abundancia y la biomasa fueron ligeramente mayores respecto a las de otoño/invierno (Tabla 3.2 y Fig. 3.8A,B).

La distribución espacial de la abundancia de los dinoflagelados fue heterogénea, con mayores abundancias en primavera/verano hacia el centro y sur de la bahía, mayormente hacia las siete millas, valores medios hacia los canales del centro y el norte (Fig. 3.9A). Un patrón similar se observó en las muestras de otoño/invierno, donde las abundancias más elevadas se encontraron hacia las siete millas tanto en el sur como en

el norte, y disminuyeron hacia la línea de costa y los canales (excepto la muestra 9, Fig. 3.9B).

Respecto a la biomasa, en la mayoría de las muestras los dinoflagelados representaron un bajo aporte (Fig. 3.9C,D), distribuido heterogéneamente en la línea de costa y las siete millas a lo largo de la bahía.

Dentro de los taxa identificados, los más abundantes fueron *Dinophysis acuminata*, *Heterocapsa triquetra*, *Heterocapsa* spp., *Prorocentrum cordatum*, *P. texanum*, *Scrippsiella acuminata* y *Tripos furca*.

3.3.1.2.3 Clorofíceas

Las clorofíceas estuvieron presentes en un 71% de las muestras y fueron el tercer grupo más relevante en términos de abundancia total (Tabla 3.2). La abundancia fue mayor en otoño/invierno, alcanzando un pico de $2,3 \times 10^6$ cél. l⁻¹, aunque la biomasa fue más alta en primavera/verano (Tabla 3.2 y Fig. 3.8A,B).

En cuanto a su distribución, en primavera/verano la abundancia se asoció mayormente a los canales de la región centro y de la región sur, y en menor medida a las siete millas (Fig. 3.9A). En otoño/invierno, las clorofíceas incrementaron su distribución en el norte, expandiéndose hacia la línea de costa y las siete millas en el centro, y permaneciendo asociadas a los canales en el sur (Fig. 3.9B). La biomasa siguió patrones similares a los mencionados para la abundancia en ambos grupos de estaciones (Fig. 3.9C,D).

Los taxa más abundantes en las muestras fueron *Monoraphidium arcuatum*, *Oocystis* spp., *Pediastrum duplex*, *Pseudopediastrum* spp. y *Scenedesmus* spp. Mientras que, en términos de biomasa, los taxa dominantes fueron *Oocystis* spp. y *Pediastrum* spp.

3.3.1.2.4 Prasinofíceas

Las prasinofíceas estuvieron presente en un 70% de las muestras y fueron el segundo grupo en términos de aporte de abundancia celular promedio (Tabla 3.2). Presentaron mayor abundancia promedio en primavera/verano, disminuyendo en otoño/invierno (Tabla 3.2 y Fig. 3.8A). En términos de biomasa, fue mayor en primavera/verano respecto a otoño/invierno, pero en este último presentaron un pico de aporte de carbono (Tabla 3.2 y Fig. 3.8B).

La distribución de la abundancia de las prasinofíceas fue amplia y no mostró un patrón definido (Fig. 3.9A,B). En general, en primavera/verano dominaron algunas muestras de la línea de costa en el norte y centro, y hacia las siete millas en el sur (Fig. 3.9A). En otoño/invierno estuvieron asociadas a los mismos sectores, pero con menor presencia en las muestras del centro y sin dominar casi ninguna muestra (excepto EG 68, Fig. 3.9B). El aporte de biomasa en primavera/verano fue muy bajo, concentrándose en pocas muestras del centro cerca de la línea de costa y las siete millas (Fig. 3.9C), mientras que en otoño/invierno se registró un mayor aporte en el norte hacia las siete millas (Fig. 3.9D).

Los taxa hallados pertenecientes a este grupo fueron *Pyramimonas* spp. y *P. longicauda*.

3.3.1.2.5 Cianobacterias

Las cianobacterias estuvieron presentes en el 50% de las muestras y fueron importantes en términos de aporte de abundancia promedio (Tabla 3.2). La abundancia fue mayor en otoño/invierno (Tabla 3.2 y Fig. 3.8A), mientras que la biomasa siguió un patrón opuesto, siendo mayor en promedio en primavera/verano (Tabla 3.2 y Fig. 3.8B).

La distribución de la abundancia en primavera/verano estuvo concentrada en la región sur de la bahía asociada a canales y a las siete millas (Fig. 3.9A). En otoño/invierno presentaron un patrón similar, con un incremento hacia el centro en los canales y la línea de costa (Fig. 3.9B). El aporte de carbono en todas las estaciones fue mayor en los canales hacia el centro y sur (Fig. 3.9C,D), y ocasionalmente en muestras del centro hacia la línea de costa.

Los taxa identificados más representativos en abundancia fueron *Anabaena* spp., *Merismopedia* spp., *Microcystis* spp., *Nodularia* spp. y *Oscillatoria* spp. En términos de biomasa, *Anabaena* spp. fue el taxón dominante.

3.3.1.2.6 Fitoflagelados

Este grupo incluye criptofíceas y flagelados fotosintéticos no identificados de hasta 15 µm aproximadamente. Estuvieron presentes en un 47% de las muestras y fueron importantes en términos de aportes de abundancia celular (Tabla 3.2). Presentaron una mayor abundancia y biomasa promedio en otoño/invierno, mientras que en primavera/verano los valores fueron notablemente menores (Tabla 3.2 y Fig. 3.8A,B).

La abundancia y biomasa de este grupo en primavera/verano estuvo principalmente limitada a muestras del norte y centro hacia las siete millas (Fig. 3.9A,C), mientras que en otoño/invierno, la distribución fue más amplia y heterogénea, dominando en algunas muestras de la línea de costa y siete millas, y con mayor presencia y aporte de carbono en canales y siete millas del centro y sur (Fig. 3.9B,D).

3.3.1.2.7 Otros grupos

Entre los grupos con baja representación en las muestras (menor al 40%) y baja abundancia celular se encuentran los cocales indeterminados, un grupo de unicelulares fototróficos que presentaron mayor abundancia promedio en primavera/verano (Tabla 3.2 y Fig. 3.8A). En cuanto a la biomasa, el aporte fue bajo, levemente mayor en otoño/invierno, período en el que se registró un pico máximo (Tabla 3.2 y Fig. 3.8B).

Las euglenofíceas mostraron mayor abundancia y biomasa en otoño/invierno respecto a primavera/verano (Tabla 3.2 y Fig. 3.8A,B). Entre los taxa identificados se pueden mencionar a *Euglena* spp., *Phacus* spp. y *Trachelomonas* spp.

Las rafidofíceas, por otro lado, presentaron mayor abundancia y biomasa en primavera/verano respecto a otoño/invierno (Tabla 3.2 y Fig. 3.8A,B). El taxón hallado fue *Chattonella* spp.

Las dictiocofíceas y primnesiofíceas se hallaron en pocas muestras (un 18% cada grupo respecto al total de muestras analizadas). Ambas presentaron una abundancia levemente mayor en otoño/invierno respecto a la hallada en primavera/verano, aunque el aporte de carbono para cada grupo siguió un patrón opuesto (Tabla 3.2 y Fig. 3.8A,B).

La distribución espacial de estos grupos se analizó de manera integral debido a sus bajas abundancias y biomasa. En general, la abundancia en primavera/verano y otoño/invierno estuvo mayormente concentrada en las siete millas hacia el centro y sur de la bahía (Fig. 3.9A,B), mientras que la biomasa en primavera/verano se concentró hacia las siete millas en el centro y sur. En otoño/invierno, la biomasa estuvo mayormente asociada a canales y línea de costa en el centro y sur (Fig. 3.9C,D).



Fig. 3.8. Abundancia (A) y biomasa (B) relativa de los grupos de fitoplancton. Los números 40-100 corresponden a los códigos de las muestras ordenadas cronológicamente por grupo de estación (Anexo 1, Capítulo 9).

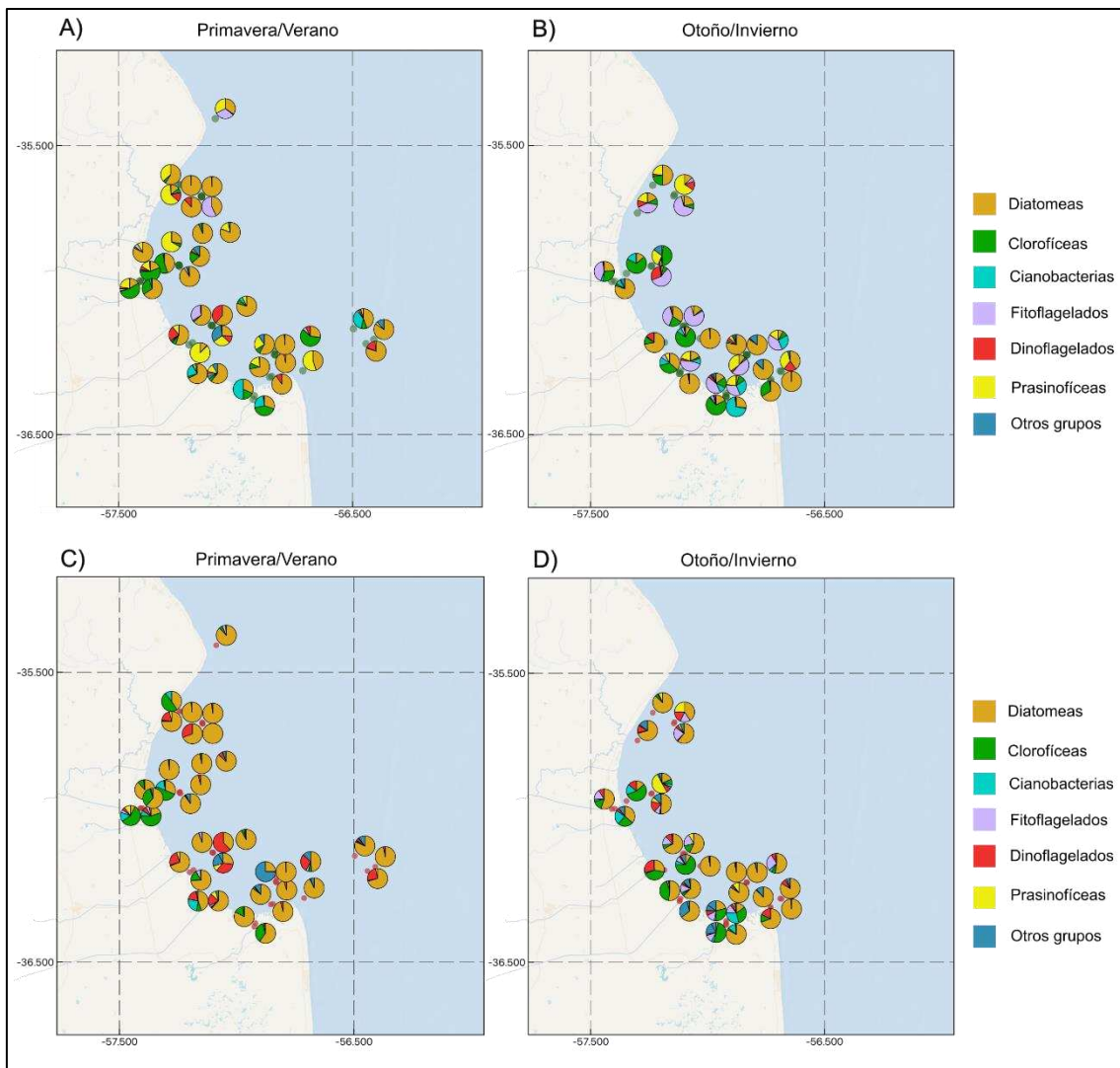


Fig. 3.9. Distribución espacial de los grupos taxonómicos identificados. **A**, abundancia relativa en primavera/verano, **B**, abundancia relativa en otoño/invierno, **C**, biomasa relativa en primavera/verano y **D**, biomasa relativa en otoño invierno. Otros grupos reúne las abundancias y biomasa de los cocales indeterminados, euglenofíceas, rafidofíceas, dictiocofíceas y primnesiofíceas.

3.3.2 Campañas realizadas desde la costa (2019 – 2021)

3.3.2.1 Características físicas generales del agua. Variación temporal

La Tabla 3.3 resume las tendencias generales de temperatura, salinidad, pH, oxígeno disuelto y turbidez para todo el período de estudio.

Tabla 3.3. Valores superficiales mínimos, máximos, promedio y error estándar de las variables ambientales medidas en el agua de mar superficial durante todo el período de estudio. N = 82.

	Mínimo	Máximo	Promedio	Error estándar
Temperatura (°C)	8,0	27,0	19,9	0,5
Salinidad	0,5	25,4	10,7	0,7
pH	7,7	11,1	9,0	0,1
OD (ppm)	0,7	14,6	7,3	0,3
Transparencia (cm)	4,0	31,0	14,4	0,8

La temperatura superficial media del agua para todo el período de estudio fue de 19,9 °C (Tabla 3.3) y, al igual que en los muestreos realizados desde embarcación, siguió los patrones esperados para un área con fuerte estacionalidad. El valor mínimo promedio fue de 13,6 °C en invierno y el valor más bajo (8,0 °C) se encontró en julio del 2021 en Tapera de López. El valor máximo promedio (25,4 °C) fue hallado en verano, con un máximo de temperatura (27,0 °C) registrado en enero del 2020 en Cerro de la Gloria (Fig. 3.10A). Se encontraron diferencias significativas entre estaciones (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). Las comparaciones por pares (Wilcoxon con corrección de Bonferroni) indicaron que invierno y otoño no difirieron significativamente entre sí ($p = 0,51$), ni primavera y verano ($p = 0,052$), mientras que las demás estaciones fueron significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$).

La salinidad superficial promedio de todo el período de estudio fue de 10,7 (Tabla 3.3), oscilando entre un mínimo promedio de 8,7 en otoño y un máximo de 25,4 en verano (Fig. 3.10). El mínimo (0,5) se registró en Río Samborombón en septiembre del 2021, mientras que el máximo (25,4) fue hallado en el mismo sitio durante el invierno, en agosto del 2021. No se hallaron diferencias significativas de salinidad entre estaciones (Kruskal-Wallis, $p = 0,13$). Las comparaciones por pares (Wilcoxon con corrección de Bonferroni) confirmaron la ausencia de diferencias significativas entre estaciones ($p > 0,05$ en todos los casos), aunque dentro de cada estación se observaron grandes fluctuaciones (Fig. 3.10B).

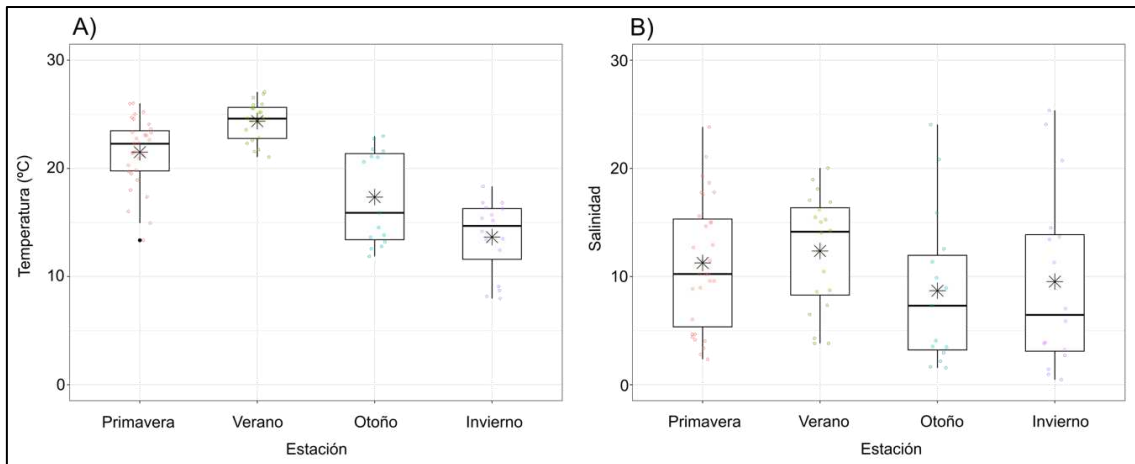


Fig. 3.10. Gráfico de cajas de temperatura (A) y salinidad (B). Los asteriscos indican el valor promedio. Primavera n=31, verano n=20, otoño n=15, invierno n=16.

El pH superficial fue alcalino durante todo el período de estudio, con una media de 9,0 (Tabla 3.3). El valor medio más bajo (8,4) se registró en verano, siendo el valor mínimo (7,7) medido en Tapera de López en enero del 2021. El valor medio más alto (9,8) se observó en invierno, y el valor máximo (11,1) en otoño (junio del 2021) en General Lavalle. Se encontraron diferencias significativas entre estaciones (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$), siendo los valores de primavera y verano menores que los de otoño e invierno ($p < 0,05$, Wilcoxon con corrección de Bonferroni).

El oxígeno disuelto superficial presentó un promedio de 7,3 ppm (Tabla 3.3). El valor medio más bajo se encontró en verano y el valor mínimo (0,7 ppm) se halló en septiembre del 2021 en Tapera de López. Durante el otoño se registró el valor medio más alto y el máximo (14,6 ppm) se observó en Cerro de la Gloria durante agosto del 2021. Se registraron diferencias significativas entre estas estaciones (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). Entre estaciones, la primavera y otoño resultaron significativamente diferentes ($p < 0,05$, Wilcoxon con corrección de Bonferroni) pero no hubo diferencias significativas entre invierno y otoño, ni entre verano y primavera ($p = 1$, Wilcoxon con corrección de Bonferroni)

La transparencia del agua de todo el período de estudio fue de 14,4 cm (Tabla 3.3). El promedio más bajo se registró en verano, con un valor mínimo (4,0 cm) medido en Río Samborombón en febrero del 2020. El valor medio más alto se registró durante el invierno, y el máximo (31,0 cm) se encontró en agosto del 2021 en General Lavalle. No se hallaron diferencias significativas entre estaciones (Kruskal-Wallis, $p = 0,8$).

3.3.2.2 Abundancia y biomasa del fitoplancton durante todo el período de estudio

La abundancia fitoplanctónica promedio fue de $2,4 \times 10^6$ cél. l^{-1} , siendo mayor en verano y disminuyendo hacia la primavera, el invierno y el otoño (Tabla 3.4). El valor máximo se registró en primavera del 2019 en Cerro de la Gloria (CG; Tabla 3.4 y Fig. 3.11). El aporte de carbono promedio fue de $300,2 \mu\text{g C } l^{-1}$, siendo más elevado en verano, seguido por el otoño, invierno y primavera (Tabla 3.4). El valor máximo se encontró durante la primavera de 2021 en Río Samborombón (RS; Tabla 3.4 y Fig. 3.11). La abundancia y la biomasa estuvieron positivamente correlacionadas (Spearman, $r = 0,51$, $p < 0,05$).

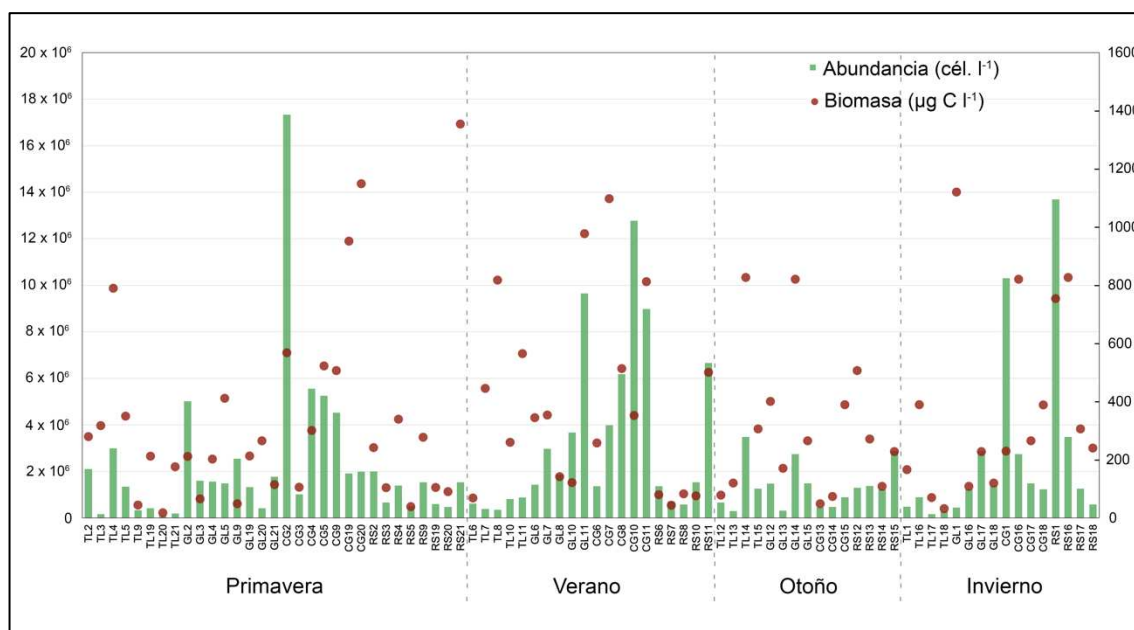


Fig. 3.11. Distribución de la abundancia (barras) y biomasa (puntos) total del fitoplancton por muestra durante todo el período de estudio. El eje X presenta las muestras ordenadas por sitio y estación, y las etiquetas corresponden a cada muestreo del Anexo 2 (Capítulo 9, Anexos).

Tabla 3.4. Valores mínimos, máximos, promedio y error estándar de abundancia celular ($\times 10^6$ cél. l^{-1}) y biomasa ($\mu\text{g C } l^{-1}$) del fitoplancton y los grupos taxonómicos en la totalidad de las muestras y por estación encontrados en las campañas realizadas desde la costa. Referencias: Mín., mínimo; Máx., máximo; \bar{X} , promedio; \pm , error estándar; Abun., abundancia; Biom., biomasa; —, no se registraron datos.

		Muestreo total				Primavera				Verano				Otoño				Invierno			
		Mín.	Máx.	\bar{X}	\pm	Mín.	Máx.	\bar{X}	\pm	Mín.	Máx.	\bar{X}	\pm	Mín.	Máx.	\bar{X}	\pm	Mín.	Máx.	\bar{X}	\pm
Total	Abun.	0,1	17,0	2,4	0,6	0,09	17,0	2,2	0,6	0,3	12,8	3,3	0,8	0,3	3,5	1,3	0,2	0,2	13,6	2,7	0,9
fitoplancton	Biom.	17,6	1354,1	300,2	34,0	17,6	1354,1	242,3	58,8	43,9	1097,7	395,8	71,7	49,2	993,0	310,1	74,5	32,0	1120,5	252,8	80,9
Diatomeas	Abun.	0,01	4,8	0,5	0,007	0,01	4,8	0,6	1,5	0,02	2,2	0,5	1,2	0,08	1,4	0,3	0,2	0,05	2,7	0,6	0,2
	Biom.	17,1	1264,6	291,8	31,6	17,1	1264,6	285,7	55,7	34,3	945,2	311,7	58,3	23,1	858,1	251,1	67,7	19,5	1107,3	317,0	77,6
Clorofíceas	Abun.	–	7,0	0,4	0,1	–	3,7	0,4	0,1	0,0004	2,2	0,3	0,1	0,05	1,8	0,4	0,1	0,004	7,0	0,8	0,4
	Biom.	–	139,0	19,3	3,1	–	135,3	17,7	4,7	0,0	124,3	17,8	7,4	0,0	62,9	20,2	5,1	0,1	139,0	23,3	8,4
Fitoflagelados	Abun.	–	2,5	0,3	0,004	–	2,5	0,3	0,09	0,05	1,0	0,4	0,06	0,005	0,7	0,2	0,4	–	0,7	0,2	0,04
	Biom.	–	10,8	1,0	0,2	–	6,7	0,9	0,2	0,1	10,8	2,0	0,5	0,1	2,2	0,7	0,1	–	1,8	0,5	0,1
Dinoflagelados	Abun.	–	0,08	0,01	0,003	–	0,07	0,01	0,003	–	0,05	0,01	0,002	0,0003	0,08	0,02	0,007	–	0,08	0,02	0,006
	Biom.	–	65,1	8,5	1,6	–	65,1	10,5	3,4	–	13,6	2,8	0,8	–	51,6	10,9	4,4	–	43,6	9,9	3,0
Cianobacterias	Abun.	–	9,1	0,9	0,3	–	8,8	0,8	0,3	–	9,1	1,7	0,6	–	0,4	0,1	0,03	0,003	9,0	0,9	0,5
	Biom.	–	253,7	17,0	4,7	0,0	253,7	15,7	8,2	–	237,2	19,3	12,0	–	101,8	13,3	7,0	0,0	120,0	20,4	9,9
Prasinofíceas	Abun.	–	0,3	0,02	0,005	–	0,2	0,02	0,008	–	0,07	0,01	0,001	–	0,05	0,01	0,004	–	0,3	0,03	0,02
	Biom.	–	29,1	1,1	0,4	–	5,4	0,7	0,2	–	15,3	1,2	0,8	–	4,3	0,6	0,3	–	29,1	2,2	1,8
Euglenofíceas	Abun.	–	0,07	0,003	0,001	–	0,05	0,003	0,001	–	0,0006	0,00008	0,00003	–	0,006	0,001	0,0006	–	0,07	0,005	0,004
	Biom.	–	86,5	4,7	1,2	–	12,0	2,0	0,6	–	3,0	0,4	0,2	–	86,5	10,8	5,8	–	43,8	5,8	2,8
Primnesiofíceas	Abun.	–	0,3	0,02	0,005	–	0,09	0,02	0,01	–	0,09	0,02	0,008	–	0,3	0,04	0,2	–	0,3	0,03	0,02
	Biom.	–	1,3	0,1	0,02	–	0,7	0,1	0,04	–	0,8	0,1	0,05	–	0,6	0,2	0,05	–	1,3	0,2	0,09
Cocales	Abun.	–	2,4	0,1	0,05	–	1,1	0,1	0,04	–	2,4	0,4	0,1	–	0,1	0,02	0,01	–	0,1	0,01	0,007
	indeterminados	Biom.	–	16,0	0,9	0,3	–	11,6	0,7	0,4	–	16,0	2,3	0,9	–	3,5	0,5	0,3	–	0,8	0,1
Dictiocofíceas	Abun.	–	0,05	0,0008	0,0005	–	0,05	0,002	0,001	–	0,008	0,0006	0,0005	–	–	–	–	–	0,00004	0,00002	0,00002
	Biom.	–	39,4	1,5	0,6	–	26,6	2,0	1,05	–	39,4	3,1	2,1	–	–	–	–	–	2,5	0,2	0,8
Rafidofíceas	Abun.	–	0,04	0,0006	0,0004	–	0,006	0,0003	0,0002	–	0,04	0,002	0,002	–	0,0004	0,0004	0,0002	–	–	–	–
	Biom.	–	632,0	8,4	7,7	–	19,0	0,7	0,6	–	632,0	31,9	31,6	–	1,0	1,7	1,2	–	–	–	–

3.3.2.3 Distribución y estructura temporal de los grupos fitoplanctónicos

Se identificaron 143 organismos pertenecientes a 11 grupos taxonómicos diferentes. Sólo las diatomeas estuvieron presentes en el 100% de las muestras analizadas, mientras que las clorofíceas, fitoflagelados, dinoflagelados, cianobacterias, prasinofíceas, euglenofíceas, primnesiofíceas, organismos unicelulares inmóviles (en adelante, cicales indeterminados), dictiocofíceas y rafidofíceas estuvieron presentes en un 95%, 94%, 85%, 77%, 66%, 59%, 52%, 38%, 20% y 10%, respectivamente. Fotografías bajo MEB de algunos representantes de estos grupos se pueden observar en el Anexo 3 (Capítulo 9, Anexos), mientras que el listado de especies y géneros identificados en esta tesis puede consultarse en el Anexo 8 (Capítulo 9, Anexos).

3.3.2.3.1 Diatomeas

Las diatomeas presentaron una abundancia promedio de $0,5 \times 10^6$ cél. l⁻¹ y una biomasa promedio de $291,8 \mu\text{g C l}^{-1}$, considerando todas las muestras analizadas (Tabla 3.4). Los valores máximos y mínimos de abundancia y biomasa se registraron en primavera (Tabla 3.4). Sin embargo, este grupo mostró una marcada fluctuación estacional, con mayores abundancias en invierno y en primavera, y menores en verano y otoño (Tabla 3.4 y Fig. 3.12A). La biomasa también fluctuó estacionalmente, alcanzando su valor máximo promedio en invierno, seguido de un descenso progresivo hacia el verano, primavera y otoño. (Tabla 3.4 y Fig. 3.12B).

Entre los taxa más abundantes se pueden mencionar a *Actinocyclus* spp., *Actinocyclus octonarius*, *Asterionellopsis glacialis*, *Ceratoneis* sp., *Chaetoceros* spp., *Coscinodiscus* spp., *Coscinodiscus radiatus*, *Entomoneis* spp., *Navicula* spp., *Nitzschia* spp., *Paralia* spp., *Surirella* spp., *Thalassiosira eccentrica*, *T. hendeyi*, *T. nodulo-lineata* y *Thalassionema nitzschioides*. En términos de biomasa, los géneros *Actinocyclus*, *Chaetoceros*, *Coscinodiscus*, *Surirella* y *Thalassiosira* fueron los dominantes.

3.3.2.3.2 Clorofíceas

Las clorofíceas tuvieron una abundancia promedio de $0,4 \times 10^6$ cél. l⁻¹ y una biomasa media de $19,3 \mu\text{g C l}^{-1}$ (Tabla 3.4). Los valores máximos de abundancia y biomasa se encontraron en invierno en Río Samborombón (RS) (Tabla 3.4 y Fig. 3.12A,B), mientras que los mínimos se registraron en verano en Tapera de López (TL) (Tabla 3.4 y Fig. 3.12A,B). Durante el invierno se observaron las mayores abundancias promedio, y en

otoño, la primavera y el verano no hubo grandes oscilaciones (Tabla 3.4 y Fig. 3.12A). La biomasa mostró un patrón similar, siendo mayor en invierno, disminuyendo ligeramente hacia el otoño, con menores oscilaciones en verano y primavera (Tabla 3.4 y Fig. 3.12B).

Los taxa más abundantes de este grupo fueron *Actinastrum* spp., *Ankistrodesmus* spp., *Coelastrum* spp., *Crucigenia* spp., *Desmodesmus abundans*, *D. bicellularis*, *D. magnus*, *D. opoliensis*, *Kirchneriella* spp., *Monoraphidium arcuatum* y *M. komarkovae*, *Oocystis* spp., *Pediastrum* spp., *Planctonema* spp. y *Tetradesmus lagerheimii*. Los géneros dominantes en términos de biomasa fueron *Oocystis* y *Pediastrum*.

3.3.2.3.3 Fitoflagelados

Este grupo presentó una abundancia media de $0,3 \times 10^6$ cél. l⁻¹ y un aporte de carbono medio de $1,0 \mu\text{g C l}^{-1}$ (Tabla 3.4). Aunque el pico máximo se registró en primavera ($2,5 \times 10^6$ cél. l⁻¹), en general, fue durante el verano donde presentaron mayor densidad y biomasa (Tabla 3.4), con un ligero descenso en primavera, y alcanzando los valores más bajos en otoño e invierno (Tabla 3.4 y Fig. 3.12A,B).

3.3.2.3.4 Dinoflagelados

Los dinoflagelados presentaron una abundancia media de $0,01 \times 10^6$ cél. l⁻¹ con un pico en otoño ($0,08 \times 10^6$ cél. l⁻¹), y una biomasa media de $8,5 \mu\text{g C l}^{-1}$ con un pico en primavera ($65,1 \mu\text{g C l}^{-1}$). Este grupo presentó fluctuación estacional, con mayores abundancias promedio en otoño e invierno, que disminuyeron en primavera y verano (Tabla 3.4 y Fig. 3.12A). La biomasa siguió un patrón similar, con valores más altos en otoño, invierno y primavera, y una disminución hacia el verano (Tabla 3.4 y Fig. 3.12B).

Entre los taxa más abundantes de este grupo se pueden mencionar a *Heterocapsa* spp., *Prorocentrum cordatum*, *Protoperidinium* spp. y *Scrippsiella* spp., y los taxones que dominaron en biomasa dentro de este grupo fueron *Protoperidinium* spp. y *Scrippsiella* spp.

3.3.2.3.5 Cianobacterias

Las cianobacterias presentaron la abundancia media más alta de todos los grupos ($0,9 \times 10^6$ cél. l⁻¹) y una biomasa media de $17,0 \mu\text{g C l}^{-1}$ (Tabla 3.4). La abundancia promedio fue mayor en verano, seguida por el invierno, primavera y otoño (Tabla 3.4 y Fig. 3.12A). La fluctuación de la biomasa durante las estaciones fue menos pronunciada,

con el valor medio más alto registrado en invierno, seguido por el verano, primavera y otoño (Tabla 3.4 y Fig. 3.12B).

Los taxa más abundantes de este grupo fueron *Anabaena* spp., *Merismopedia glauca*, *M. tenuissima*, *Microcystis* spp., *Nodularia* spp., mientras que, *Anabaena* spp. y *Microcystis* spp. fueron quienes dominaron en biomasa dentro del grupo.

3.3.2.3.6 Prasinofíceas

La abundancia media de todo el período fue de $0,02 \times 10^6$ cél. l⁻¹ y el aporte medio de carbono fue de $1,1 \mu\text{g C l}^{-1}$ (Tabla 3.4). Los mayores valores medios de abundancia celular se observaron en invierno y primavera, disminuyendo en verano y otoño (Tabla 3.4 y Fig. 3.12A). El aporte de carbono fue mayor en invierno y disminuyó en verano, seguido por la primavera y otoño, donde se registraron los valores más bajos (Tabla 3.4 y Fig. 3.12B).

Los taxa hallados para este grupo fueron *Pyramimonas* spp. y *P. longicauda*.

3.3.2.3.7 Otros grupos

Las euglenofíceas presentaron una abundancia celular media de $0,003 \times 10^6$ cél. l⁻¹, constante a lo largo del período estudiado (Tabla 3.4). La mayor abundancia se encontró en invierno, seguido por la primavera y el otoño, con el valor mínimo en verano (Tabla 3.4 y Fig. 3.12A). El aporte de carbono promedio fue de $4,7 \mu\text{g C l}^{-1}$, con los mayores valores promedio en otoño e invierno, y una disminución en primavera y verano (Tabla 3.4 y Fig. 3.12B). Los taxa dominantes en abundancia y biomasa dentro del grupo fueron *Euglena* spp., *Lepocinclis* spp., *Phacus* spp. y *Trachelomonas* spp.

Las primnesiofíceas presentaron una abundancia media de $0,02 \times 10^6$ cél. l⁻¹ y una biomasa media de $0,1 \text{ g C l}^{-1}$ durante todo el período estudiado (Tabla 3.4). Las mayores abundancias y aportes de carbono se registraron en otoño e invierno, disminuyendo hacia la primavera y el verano, sin grandes oscilaciones (Tabla 3.4 y Fig. 3.12A,B).

Los cocales indeterminados tuvieron una abundancia promedio de $0,1 \times 10^6$ cél. l⁻¹ y una biomasa media de $0,9 \mu\text{g C l}^{-1}$ para todo el período de estudio (Tabla 3.4). El verano fue la estación con los mayores valores de abundancia y biomasa, con una disminución hacia primavera, otoño e invierno (Tabla 3.4 y Fig. 3.12A,B).

Las dictiocofíceas tuvieron una abundancia media de $0,0008 \times 10^6$ cél. l⁻¹ y una biomasa media de $1,5 \mu\text{g C l}^{-1}$ durante todo el período (Tabla 3.4). En términos generales,

las mayores abundancias se registraron en primavera (media: $0,02 \times 10^6$ cél. l⁻¹), disminuyendo en verano e invierno, y no se registraron durante el otoño (Tabla 3.4 y Fig. 3.12A,B). El taxón más abundante de este grupo perteneció al género *Dictyocha*.

Las rafdofíceas presentaron una abundancia media de $0,0006 \times 10^6$ cél. l⁻¹ y una biomasa media de $8,4 \mu\text{g C l}^{-1}$. La mayor abundancia y biomasa se encontraron en verano, con una disminución en otoño y primavera (Tabla 3.4). Un pico de biomasa fue registrado en verano debido a *Chattonella* sp., alcanzando $632,0 \mu\text{g C l}^{-1}$. No se hallaron representantes de este grupo en los meses invernales (Fig. 3.12A,B). Además de la especie mencionada, se halló a *Heterosigma* sp. y *Fibrocapsa japonica*.



Fig. 3.12. Abundancia (A) y biomasa (B) relativa de los grupos de fitoplancton. Las muestras se encuentran ordenadas por estación y sitio de muestreo. Referencias, TL: Tapera de López; GL: General Lavalle; CG: Cerro de la Gloria; RS: Río Samborombón.

3.3.2.4 Relación entre la abundancia y biomasa con las variables abióticas

El análisis multivariado de redundancia (RDA) permitió comparar estadísticamente las muestras utilizando 8 variables ambientales (salinidad, temperatura, turbidez, dirección del viento, velocidad del viento, pH, oxígeno disuelto y marea).

A partir de los datos de abundancia, el RDA explicó el 86,1% de la varianza ($F_{RDA} < 0,001$). Las variables significativas, y por lo tanto incluidas en el modelo final, fueron la salinidad, temperatura y turbidez ($F < 0,005$) (Fig. 3.13). Los dos primeros ejes resultaron significativos ($F_{RDA1,2} < 0,001$), siendo el RDA1 el que explicó un 54,4% de la varianza, principalmente asociado con la salinidad. El RDA2 explicó un 31,7% de la varianza, asociándose tanto con la temperatura como con la salinidad. La especie *Asterionellopsis glacialis* y los fitoflagelados se asociaron positivamente con la salinidad mientras que *Kirchneriella* sp., *Monoraphidium arcuatum*, *Planctonema lauterbonii*, *Merismopedia glauca* y cianobacterias mostraron una asociación negativa con esta variable. A su vez, *Skeletonema* cf. *tropicum*, *Merismopedia tenuissima* y las cianobacterias coloniales se asociaron positivamente con la temperatura y negativamente con la turbidez, mientras que *Chaetoceros* spp., centrales no identificadas y *Kirchneriella* sp. se asociaron negativamente con la temperatura y positivamente con la turbidez (Fig. 3.13).

Respecto a la estacionalidad, se observó un agrupamiento de la mayoría de las muestras de invierno junto con algunas de otoño y primavera, provenientes de General Lavalle, Cerro de la Gloria y Tapera de López, asociadas negativamente con la temperatura y positivamente con la turbidez. También se identificó un agrupamiento de muestras de primavera, verano y otoño pertenecientes a Tapera de López y Río Samborombón, asociadas positivamente con la salinidad. El resto de las muestras se asoció positivamente con la temperatura y, en algunos casos, negativamente con la salinidad, pero no se distinguieron agrupamientos claros (Fig. 3.13).

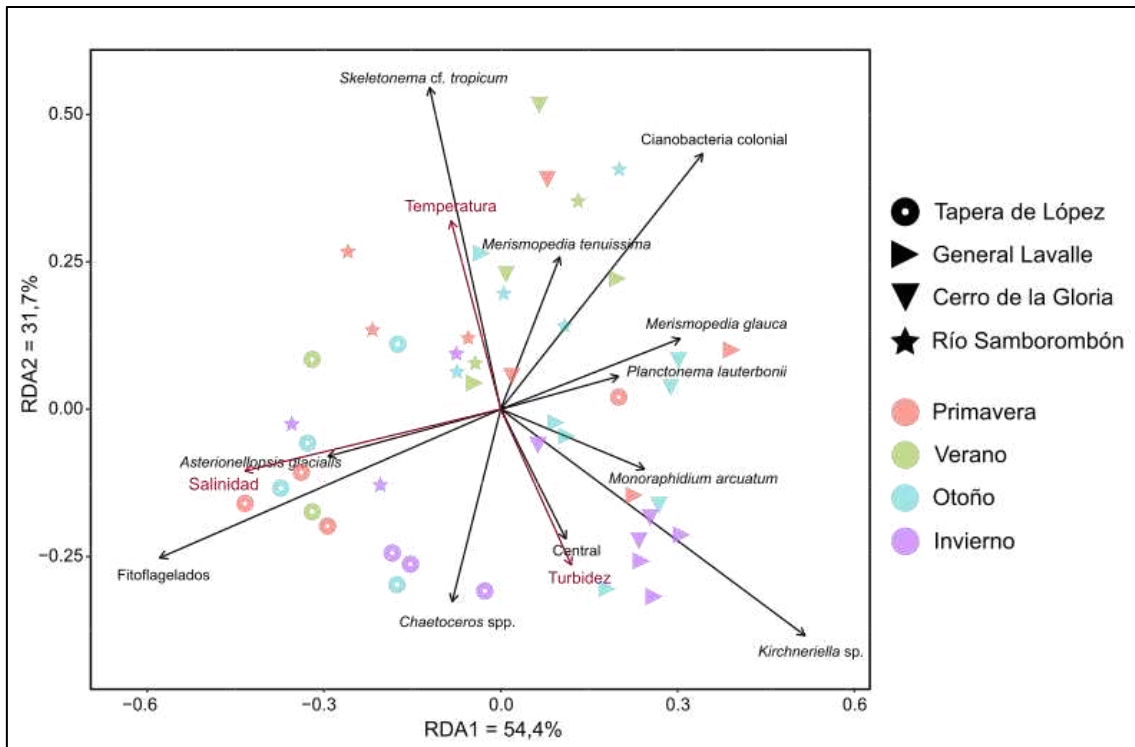


Fig. 3.13. Triplot del análisis de redundancia (RDA) que muestra las relaciones entre las variables ambientales, la abundancia de las especies significativas para el análisis, y los sitios de muestreo para cada estación. Variables ambientales (flechas y letras bordó): salinidad, temperatura, turbidez. Las muestras están etiquetadas según sitio de muestreo y estación, indicados en la leyenda de la figura.

El RDA utilizando la biomasa explicó el 66,9% de la varianza ($F_{RDA} < 0,001$), y las variables significativas incluidas en el modelo final fueron la salinidad y turbidez ($F < 0,001$). Aunque la marea fue marginalmente significativa ($F = 0,064$), se incluyó en el análisis ya que permitió observar una posible asociación con la dinámica de las especies (Fig. 3.14). El primer eje explicó un 48,8% de la varianza, siendo el único significativo ($F_{RDA1} < 0,001$), y se relacionó principalmente con la salinidad y la turbidez. El RDA2 explicó el 17,1% de la varianza, resultó no significativo ($F_{RDA2} = 0,1$) y se asoció con la marea baja y la marea subiendo. Las especies que se asociaron positivamente con la salinidad y negativamente con la turbidez fueron *Coscinodiscus* sp., *Thalassiosira lundiana*, *Actinocyclus* spp., mientras que *Surirella* sp., *Cyclotella* cf. *litoralis* y clorófitas (clorococales) se asociaron negativamente con la salinidad y positivamente con la turbidez y la marea baja.

En relación con la estacionalidad, el 70% de las muestras de otoño e invierno se asociaron negativamente con la salinidad y positivamente con la turbidez, mientras que

la misma proporción de muestras de primavera y verano se asociaron positivamente con la salinidad y negativamente con la turbidez.

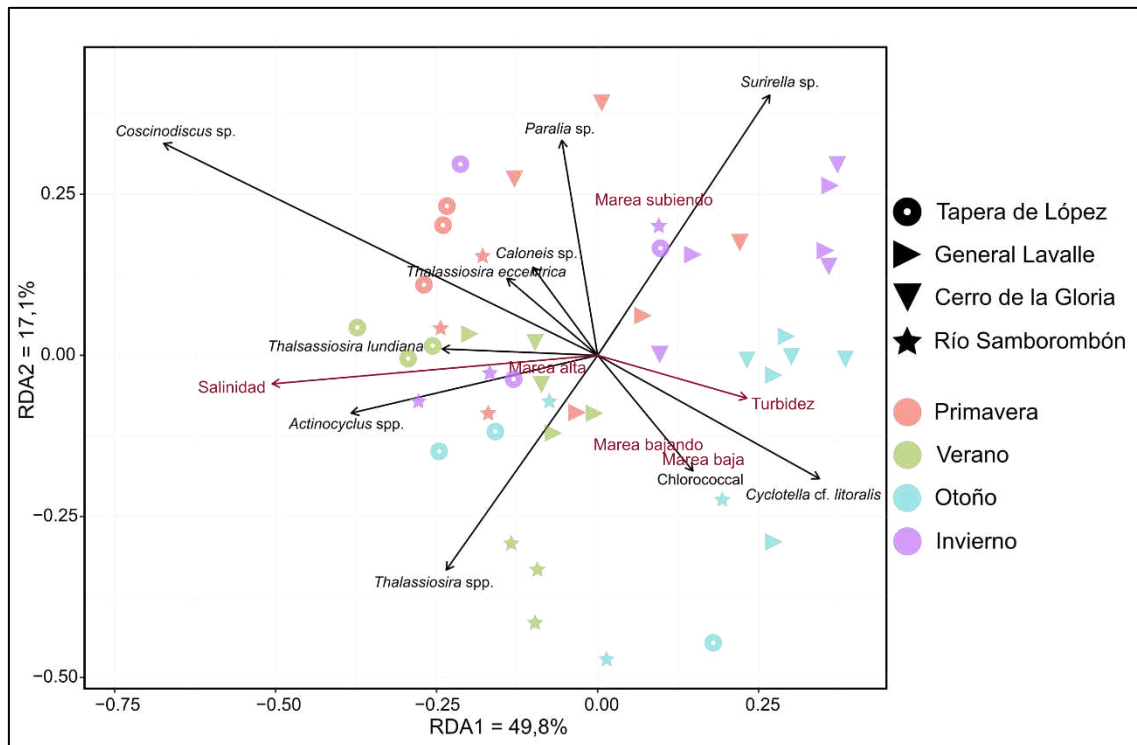


Fig. 3.14. Triplot del análisis de redundancia (RDA) que muestra las relaciones entre las variables ambientales, la biomasa de las especies significativas para el análisis, y los sitios de muestreo para cada estación. Variables ambientales (flechas y letras bordó): salinidad, turbidez y marea. Las muestras están etiquetadas según sitio de muestreo y estación, indicados en la leyenda de la figura.

3.4 Discusión

3.4.1 Tendencias generales de abundancia y biomasa fitoplanctónica

Este capítulo representa el primer estudio donde se analiza el ciclo anual del fitoplancton en la región de la bahía Samborombón y permitió caracterizarlo por presentar elevados valores de densidad celular y biomasa anual. La abundancia celular promedio considerando los muestreos en primavera/verano de las campañas realizadas desde embarcaciones y en primavera para las campañas realizadas desde la costa (aproximadamente $1,6 \times 10^6$ cél. l^{-1}) fue 18 veces mayor para la zona estuarina y unas 80 veces mayor a la reportada para la región costera (aproximadamente $0,09$ y $0,02 \times 10^6$ cél. l^{-1} , respectivamente) por Carreto *et al.* (2003), y 16 veces mayor a la observada por Gómez *et al.* (2004) para la región estuarina del Río de la Plata ($0,1 \times 10^6$ cél. l^{-1}). Cabe

destacar que la metodología de cuantificación empleada en este estudio difiere en algunos aspectos de la utilizada por Carreto *et al.* (2003). La densidad anual promedio de ambos muestreos ($1,7 \times 10^6$ cél. l^{-1}) fue similar a la reportada por García & Bonel (2014) ($1,1 \times 10^6$ cél. l^{-1}). Sin embargo, García & Bonel (2014) encontraron que la densidad, pero no la biomasa, disminuía en los sitios más cercanos a la boca del estuario, donde la salinidad y la turbidez aumentan. En contraste, en este estudio se determinó que la abundancia fitoplanctónica fue mayor en los canales hacia el centro y sur, donde los valores de salinidad fueron generalmente más altos que en otros sitios de la bahía. Es relevante mencionar que el estudio de García & Bonel (2014) se basó en un muestreo a lo largo de la región interna del Río de la Plata, por lo que las variables ambientales, especialmente la salinidad, presentan variaciones.

El Río de la Plata, conocido por descargar grandes cantidades de nutrientes al estuario (Carreto *et al.*, 1986), se encuentra rodeado de zonas de alta productividad agrícola-ganadera, actividades industriales y creciente urbanización, lo que incrementa aún más su disponibilidad (Mianzan *et al.*, 2001). Este enriquecimiento puede explicar las altas abundancias fitoplanctónicas observadas, lo que a su vez sugiere un escenario donde la biomasa no consumida por depredadores incrementa la actividad bacteriana y reduce los niveles de oxígeno disuelto, disminuyendo la presión de pastoreo por parte del zooplancton (Paerl *et al.*, 2003; Kromkamp & Peene, 2005). Sin embargo, el oxígeno disuelto en este trabajo presentó valores similares a los hallados en otros estuarios de Argentina (Guinder, 2011), y en los análisis de redundancia (Figs. 3.13, 3.14) no resultó una variable significativa para explicar las altas abundancias encontradas. La presión de pastoreo parece influir notablemente en la dinámica fitoplanctónica (Gómez *et al.*, 2004) y la disponibilidad de oxígeno observada en este estudio sugiere que la mezcla de la columna de agua tiene un papel importante en esta variable.

En cuanto a la biomasa, el promedio de ambos muestreos en primavera ($196,1 \mu\text{g C } l^{-1}$) fue ligeramente menor al valor reportado por Gómez *et al.* (2004) para la región estuarina ($231 \mu\text{g C } l^{-1}$). Sin embargo, el promedio anual obtenido en este estudio resultó considerablemente mayor al hallado por García & Bonel (2014) ($3,5 \mu\text{g C } l^{-1}$), destacando la relevancia de la bahía Samborombón en la acumulación de biomasa fitoplanctónica. Licursi *et al.* (2006) encontraron que, en la región mixohalina, solo el 17% de la biomasa correspondía a diatomeas, mientras que la mayor parte fue aportada por

dinoflagelados. En contraste, en este estudio, las diatomeas representaron la principal fuente de carbono en la mayoría de las muestras de primavera considerando ambos muestreos. Por otro lado, en este trabajo se observó que la abundancia y biomasa de algunas especies de diatomeas se asociaron positivamente con la turbidez, en concordancia con lo descrito por Gómez *et al.* (2004) para la primavera del 2001. En las primaveras analizadas por Carreto *et al.* (2003), Calliari *et al.* (2005, 2009) y en el estudio anual de García & Bonel (2014), la biomasa del microfitoplancton, principalmente compuesta por diatomeas, se encontraba asociada a regiones de mayor salinidad y turbidez. Este patrón, también observado en este trabajo, podría explicarse dado que algunas presentan una relación superficie-volumen que se beneficia de la turbulencia para mantenerse suspendidas en la zona fótica (Capriulo *et al.*, 2002) y responden de manera más eficiente que otros fitopláncteres de menor tamaño a las fluctuaciones en la disponibilidad de luz (Kjørboe, 1993). En ambientes como el estuario del Río de la Plata, ricos en nutrientes (Negri *et al.*, 1988; Gómez *et al.*, 2004) pero con baja transparencia debido a la resuspensión de partículas, la luz se convierte en el principal factor limitante (Underwood & Kromkamp, 1999). En este estudio, la transparencia promedio del agua fue de 14,4 cm, un valor esperable debido a la presencia del frente de turbidez que sigue la geometría de la bahía Samborombón (Acha *et al.*, 2008). Esta condición de gran cantidad de sedimentos, junto con la mezcla de la columna de agua debida a los vientos, podría explicar que la biomasa dominante sea de diatomeas.

Como se mencionó en la Introducción de este capítulo, las larvas de corvina rubia se alimentan principalmente de zooplancton, cuya distribución y abundancia están determinadas en parte por el fitoplancton. En el estuario del Río de la Plata, en las zonas de máxima turbidez, la producción secundaria sustentada por el detrito orgánico tendría un rol importante en las tramas tróficas (Mianzán *et al.*, 2001). Las altas abundancias y biomasa de diatomeas registradas en este estudio sugieren que la producción primaria podría ser responsable de las altas densidades de las comunidades microzooplanctónicas encontradas en este sector (Kogan, 2005). A pesar de que la luz actúa como factor limitante para el crecimiento fitoplanctónico, la gran disponibilidad de alimento, la turbidez que ofrece refugio y las condiciones hidrográficas que generan

un efecto de retención, explican que las máximas abundancias históricas de larvas de corvina rubia se concentren en este sector (Braverman, 2011).

3.4.2 Composición fitoplanctónica

En el presente estudio se detectaron 266 taxa considerando ambos muestreos, de los cuales 254 pudieron ser determinados hasta nivel de género o especie (ver Anexo 8, Capítulo 9), un número levemente superior al reportado por Gómez *et al.* (2004,) para la primavera del 2001 (224 taxa). Seis grupos taxonómicos principales destacaron en términos de ocurrencia, con las diatomeas como el más relevante, presentes en el 100% de las muestras. Este grupo dominó en un 48% de las muestras obtenidas desde embarcación y en un 18% de las muestras colectadas desde la costa. Los géneros *Actinocyclus*, *Coscinodiscus*, *Cyclotella*, *Skeletonema*, *Thalassiosira* y *Thalassionema* fueron los más frecuentes, coincidiendo con los citados para otras regiones del estuario (Carreto *et al.*, 2003; Gómez *et al.*, 2004; Carreto *et al.*, 2008; García & Bonel, 2014) y en otros estuarios de la Provincia de Buenos Aires (Guinder, 2011). Las diatomeas más frecuentes en este estudio, caracterizadas por su gran tamaño, parecen estar adaptadas a las condiciones de luz limitantes del estuario, beneficiándose de la turbulencia, como se ha discutido en la sección 3.4.1.

En contraste, los dinoflagelados mostraron una baja abundancia en ambos muestreos y no dominaron ninguna muestra. Los géneros identificados, como *Prorocentrum*, *Scrippsiella* y *Dinophysis*, coinciden con los mencionados en estudios anteriores (Negri *et al.*, 1988; Carreto *et al.*, 2003; Gómez *et al.*, 2004). Gómez *et al.* (2004) encontraron que los dinoflagelados se asociaban positivamente con la salinidad y negativamente con la turbidez. Sin embargo, en este estudio, las especies de dinoflagelados no resultaron significativas en los análisis de redundancia (RDA). Esto podría deberse a que dichos análisis se basaron en las muestras obtenidas desde la costa, donde los dinoflagelados presentaron baja abundancia y biomasa, posiblemente debido a la alta turbidez y baja salinidad, a diferencia de lo observado en las muestras colectadas desde embarcación, en las que este grupo presentó mayores valores de estas variables. En consonancia con los resultados de Gómez *et al.* (2004), los dinoflagelados aumentaron su densidad a medida que aumentó la distancia a la costa, donde disminuye

la turbidez y aumenta la salinidad, como se evidenció a partir de los resultados de ambos muestreos.

Las clorofíceas y cianobacterias fueron importantes en términos de abundancia en ambos muestreos, dominando o co-dominando en numerosas muestras, especialmente las cianobacterias en los muestreos realizados desde la costa. Estos grupos mostraron una asociación negativa con la salinidad presentando mayor biomasa y abundancia en la desembocadura de los tributarios a la bahía, como se observó en las muestras colectadas desde la costa. Este patrón es consistente con los resultados de Gómez *et al.* (2004) para el eje fluvio-estuarino en primavera y los resultados anuales hallados por García & Bonel (2014), quienes determinaron que la distribución de estos grupos estaba influenciada por la descarga dulceacuícola y limitada por las entradas de agua salina. Los géneros y especies más abundantes hallados en este estudio coinciden con aquellos mencionados por Carreto *et al.* (2003), Gómez *et al.* (2004) y García & Bonel (2014).

Las prasinofíceas y los fitoflagelados, que incluyen criptofíceas y otros taxa no identificados, fueron importantes en términos de abundancia. Las prasinofíceas estuvieron presentes en más de un 65% de las muestras considerando ambos muestreos y, al igual que lo observado por Carreto *et al.* (2003), fueron dominantes o co-dominantes junto con las diatomeas en algunas muestras de primavera. Los fitoflagelados, si bien co-dominaron en términos de abundancia en numerosas muestras de primavera y verano (Fig. 3.12A), no fueron el segundo grupo más importante al considerar ambos muestreos. Esto difiere de lo observado a partir de la abundancia de aloxantina por Carreto *et al.* (2003) para la primavera de 1999, durante la cual el grupo de las criptofíceas fue el segundo más abundante en el sector estuarino después de las diatomeas. En este estudio las criptofíceas se cuantificaron junto con el resto de los fitoflagelados no identificados, por lo que no se puede establecer su dinámica en particular. Aun así, los fitoflagelados estuvieron presentes en un 50% de las muestras obtenidas desde embarcación y en un 94% de las muestras obtenidas desde la costa, representando organismos frecuentes, con una distribución espacial amplia y heterogénea.

Aunque las diatomeas, dinoflagelados, clorofíceas y cianobacterias fueron los grupos principales en términos de abundancia y biomasa, los grupos de euglenofíceas,

primnesiofíceas y dictiocofíceas también son frecuentes dentro de la composición fitoplanctónica de la bahía Samborombón y los taxa hallados coinciden con los mencionados por Gómez *et al.* (2004), Carreto *et al.* (2008) y García & Bonel (2014). Estos grupos taxonómicos, aunque menos abundantes, pueden desempeñar roles ecológicos importantes en el sistema.

Finalmente, este trabajo aporta el primer registro de especies pertenecientes a la Clase Raphidophyceae que no habían sido previamente citadas para la bahía Samborombón, y que sólo se habían identificado en la región más externa del estuario del lado uruguayo (Méndez *et al.*, 2010).

3.5 Conclusiones

En este capítulo se presenta una primera caracterización de la variación espacio-temporal del fitoplancton en la bahía Samborombón durante los años 2016 a 2021. Los estudios previos sobre el fitoplancton en el área se han limitado generalmente a una única estación (primavera) y no han abarcado a la bahía Samborombón en particular.

Los resultados obtenidos permiten inferir que esta región presenta una gran acumulación de fitoplancton en términos de abundancia y biomasa durante todo el año, con un marcado incremento en primavera y verano. El mismo se caracteriza por la predominancia de diatomeas de gran tamaño, clorofíceas y cianobacterias, acompañadas por una notable diversidad de especies pertenecientes a otros grupos taxonómicos.

En este estudio se registraron densidades y aportes de carbono superiores a los reportados en trabajos previos en zonas aledañas del estuario, a pesar de la turbidez característica de la zona. Esto sugiere que la bahía Samborombón es un área con una alta acumulación de recursos alimenticios, crucial para el sustento de larvas, peces y otros organismos.

En términos espaciales no se detectaron asociaciones fitoplanctónicas notablemente diferentes, probablemente debido al aporte constante de fitoplancton proveniente de los ríos y tributarios que desembocan en la bahía. Sin embargo, los dinoflagelados mostraron una distribución más acotada, asociada negativamente con la

turbidez y positivamente con la salinidad. En general, el fitoplancton en la bahía muestra una relativa homogeneidad tanto en sentido latitudinal y longitudinal.

Estos resultados confirman en gran medida la hipótesis planteada, evidenciando que la abundancia y biomasa del fitoplancton son mayores en estaciones cálidas (primavera/verano para muestreos desde embarcación y verano para muestreos desde la costa) y, en general, estos valores fueron más elevados en áreas con mayor salinidad. La variabilidad en la composición fitoplanctónica no mostró una relación clara con el gradiente de salinidad, exceptuando el caso de los dinoflagelados, cuya distribución estuvo más acotada y asociada a variaciones en la turbidez y salinidad. Esto sugiere que otros factores ambientales y la influencia de aportes externos pueden estar modulando la estructura del fitoplancton en la bahía. Estudios futuros que incorporen análisis de nutrientes, dinámica de corrientes y otras variables ambientales podrían aportar mayor claridad sobre los procesos que regulan la distribución y composición de la comunidad fitoplanctónica en este ecosistema costero.

Capítulo 4

Chattonella marina

4.1 – Introducción

El género *Chattonella* Biecheler, perteneciente a la Clase Raphidophyceae, se caracteriza por presentar células desnudas y asimétricas con una depresión anterior de la que emergen dos flagelos desiguales y heterodinámicos, numerosos cloroplastos elipsoidales de color amarillo-amarronado y mucocistos debajo de la superficie celular (Doan & Moestrup, 2004; Imai & Yamaguchi, 2012). Los primeros análisis taxonómicos de las especies de este género se basaron en caracteres morfológicos como la forma y el tamaño celular, la presencia/ausencia de mucocistos, el desarrollo de vacuolas en el ectoplasma, la forma y disposición de los cloroplastos y la presencia/ausencia de tilacoides en la matriz del pirenoide (Hara & Chihara, 1982; Hara en Fukuyo *et al.*, 1999; Hallegraeff & Hara, 2004).

De acuerdo con Hallegraeff & Hara (2004), el género estaba conformado por siete especies: *C. subsalsa* Biecheler (especie tipo), *C. ovata* Hara et Chihara, *C. minima* Hara et Chihara, *C. verruculosa* Hara et Chihara, *C. globosa* Hara et Chihara, *C. marina* (Subrahmanyam) Hara et Chihara y *C. antiqua* (Hada) Ono. Hosoi-Tanabe *et al.* (2012) incorporaron al análisis morfológico de *C. verruculosa* el análisis de datos moleculares y la transfirieron al género *Pseudochattonella* Tanabe-Hosoi, Honda, Fukaya, Inagaki et Sako como *P. verruculosa* (Y. Hara et Chihara) Hosoi-Tanabe, Honda, Fukaya, Inagaki et Sako, y sobre esa misma base, Chang *et al.* (2012) transfirieron *C. globosa* al género *Vicicitus* F.H. Chang como *V. globosus* (Y. Hara & Chihara) F.H. Chang, ambas dentro de la Clase Dictyochophyceae. Asimismo, Demura *et al.* (2009) estudiaron las divergencias genéticas entre *C. antiqua*, *C. ovata* y *C. marina*, determinando que eran insuficientes para justificar su distinción en el rango de especie, y dado que la última tenía prioridad de nombre, formularon para las dos primeras un nuevo estatus: *C. marina* var. *antiqua* (Hada) Demura & Kawachi y *C. marina* var. *ovata* (Y. Hara & Chihara) Demura & Kawachi. En este sentido, Imai & Yamaguchi (2012) propusieron que las tres especies fueran tratadas como el complejo *C. marina*, debido a que la cepa de *C. marina* de la localidad tipo no había sido oportunamente estudiada por Demura *et al.* (2009). Posteriormente,

Lum *et al.* (2021) incluyeron a *C. minima* en el complejo a partir de los análisis moleculares realizados por Kamikawa *et al.* (2007). Recientemente, Lum *et al.* (2022) describieron dos nuevas especies: *C. tenuiplastida* W.M. Lum, H.C. Lim, K. Takahashi, S.T. Teng, Benico & Iwataki, y *C. malayana* W.M. Lum, H.C. Lim, S.T. Teng, K. Takahashi, Leaw, P.T. Lim & Iwataki. En resumen, hasta la fecha se reconocen cuatro especies respaldadas filogenéticamente como pertenecientes al género *Chattonella* (complejo *C. marina*, *C. subsalsa*, *C. tenuiplastida* y *C. malayana*).

Actualmente existe un consenso de que la identificación de especies del género *Chattonella* basada solo en la morfología no es adecuada debido a la alta plasticidad morfológica y a la dificultad de su manipulación debido a la fragilidad de sus células (Branco *et al.*, 2019; Lum *et al.*, 2022). La caracterización genética utilizando la subunidad pequeña (SSU), la región del espaciador transcrito interno (ITS) y la subunidad grande (LSU) del ADN ribosómico nuclear y/o los genes *psaA* y *rbcl* codificados en el cloroplasto, son una herramienta indispensable para la determinación taxonómica de este grupo (Hosoi-Tanabe *et al.*, 2007; Kamikawa *et al.*, 2007; Demura *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2012; Klöpffer *et al.*, 2013; Lum *et al.*, 2021, 2022).

El complejo *Chattonella marina* y la especie *C. subsalsa* crecen en distintos rangos de temperatura y salinidad (Khan *et al.*, 1995; Marshall & Hallegraeff, 1999; Lum *et al.*, 2023), por lo que se encuentran ampliamente distribuidas y han sido registradas en aguas marinas tropicales, subtropicales y templadas, así como en estuarios (Marshall & Hallegraeff, 1999; Band-Schmidt *et al.*, 2004; Imai & Yamaguchi, 2012; Méndez *et al.*, 2013; Branco *et al.*, 2019; Viana *et al.*, 2019). Estas especies representan las únicas del género que han sido citadas en Sudamérica, habiendo sido registradas en Argentina, Brasil, Ecuador y Uruguay (Sunesen *et al.*, 2021 y referencias allí).

Las rafidofíceas marinas son organismos de interés para los programas de monitoreo de floraciones algales nocivas (FAN) debido a que algunas especies pertenecientes a diferentes géneros dentro de esta Clase son ictiotóxicas, han producido considerables mortandades de peces y han llevado a grandes pérdidas económicas (Hallegraeff & Hara, 2004; Imai & Yamaguchi, 2012). FAN de *Chattonella* spp. y daños asociados a peces silvestres o cultivados han sido documentados en Australia, Brasil, Canadá, China, India, Italia, Japón, Corea, Malasia, México y Filipinas (Lum *et al.* 2021 y referencias allí). El modo de acción de los compuestos citotóxicos que causan

estas mortandades no ha sido completamente dilucidado. Algunos estudios (Khan *et al.* 1996a; Haque & Onoue 2002) sugieren que las brevetoxinas (BTX) están implicadas en los efectos ictiotóxicos de las especies de rafdofíceas. Sin embargo, de acuerdo con MacKenzie (2008) el rol de estos compuestos sigue siendo controversial, ya que análisis realizados en cepas australianas para detectar BTX fueron débilmente positivos (Hallegraeff *et al.*, 1998), pero trabajos posteriores utilizando métodos de LC MS/MS más sofisticados arrojaron resultados negativos (Marshall *et al.*, 2003; Hallegraeff *et al.*, 2017).

Las hipótesis planteadas en la literatura sobre los mecanismos de ictiotoxicidad que causan daños a las branquias y conducen a la asfixia de peces son: la obstrucción mecánica de las branquias a partir de la secreción de mucus que conduce a la hipoxia y finalmente a la asfixia (Ishimatsu *et al.*, 1991, 1996; Hishida *et al.*, 1997); la producción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés) (Marshall *et al.*, 2003) que son propensos a la degradación oxidativa porque los radicales libres toman electrones de las membranas lipídicas, con el consiguiente daño celular (Hallegraeff *et al.*, 2017); y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) (Hallegraeff *et al.*, 2017), que son moléculas inestables que reaccionan rápidamente con otras moléculas produciendo daños en el ADN, ARN y proteínas. Sin embargo, Marshall *et al.* (2003) demostraron que las ROS por sí solas no producen mortandad, y que es la sinergia entre PUFAs y ROS la que acelera la tasa de mortalidad (Marshall *et al.*, 2003; Hallegraeff *et al.*, 2017 y referencias allí). Una alternativa interesante para probar la citotoxicidad de microalgas es la realización de experimentos utilizando líneas celulares de branquias de peces (Dorantes-Aranda *et al.*, 2011). Dorantes-Aranda *et al.* (2011, 2013) testearon la citotoxicidad de distintas cepas del complejo *C. marina* en líneas celulares RTgill-W1 derivadas de branquias de trucha arcoíris (*Onchorynchus mykiss*), utilizando como tratamientos microalgas intactas y lisadas, y encontraron que la mortalidad de las líneas fue mayor cuando éstas se expusieron a las células lisadas. Estos resultados, sin embargo, pueden ser controversiales ya que se esperaría que los compuestos líticos producidos por las microalgas sean activamente liberados al medio como un mecanismo de defensa contra predadores o una respuesta alelopática a la competencia.

A pesar de la relevancia de *Chattonella* como productor de eventos tóxicos en distintas regiones del mundo, hasta el momento este género no ha sido estudiado fehacientemente para Argentina. Debido a la importancia de la bahía Samborombón como área de cría de peces, el objetivo de este capítulo es proporcionar la primera caracterización de las cepas de *Chattonella* aisladas del área sobre la base a su morfología, filogenia, el perfil pigmentario, la tasa de crecimiento y su citotoxicidad.

4.2 – Metodología

Dos cepas del género *Chattonella* (LPCc046 y LPCc047) fueron aisladas de las muestras LPC 13715 y LPC 13727, respectivamente, ambas colectadas en Tapera de López, bahía Samborombón. La metodología de toma de muestras y de aislamiento de cepas se encuentra descrita en la sección 2.1.2 y 2.2.1 del Capítulo 2 (Materiales y Métodos). Una cepa del mismo género (LPCc045) aislada de una muestra proveniente de Santa Teresita (LPC 11471) fue incluida en los análisis a fin de complementar la información de este trabajo. LPCc045 fue colectada, cultivada y analizada siguiendo la misma metodología que las cepas provenientes de bahía Samborombón. El detalle de las fechas y sitios de colecta, variables ambientales y código de acceso al GenBank se encuentran resumidos en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Datos generales sobre las tres cepas de *Chattonella* aisladas.

Cepa	Sitio de muestreo y código de herbario	Temperatura y salinidad del agua	Fecha	Aislador	Número de acceso GenBank
LPCc046	Tapera de López	21,5 °C	15/03/2020	Aguiar	OR088598
	LPC 13715	18,9		Juárez D.	
LPCc047	Tapera de López	23,6 °C	28/02/2021	Aguiar	OR095727
	LPC 13727	20,0		Juárez, D.	
LPCc045	Santa Teresita	23,0 °C	02/02/2017	Sunesen, I.	OR096705
	LPC 11471	20,7			

El análisis morfológico fue realizado de acuerdo con lo descrito en el Capítulo 2 (Materiales y Métodos), secciones 2.2.3.1 para microscopía óptica (MO), 2.2.2.3 y 2.2.3.3 para microscopía electrónica de transmisión (MET); y el análisis cuantitativo de las cepas fue realizado según lo especificado en la sección 2.2.4.

Los análisis filogenéticos fueron hechos según lo detallado en la sección 2.3 del Capítulo 2 utilizando 678 pb y datos de secuencias disponibles en GenBank (Anexo 4, Capítulo 9). Para enraizar el árbol de máxima verosimilitud se utilizó una secuencia de la diatomea *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & J.C. Lewis.

Los análisis de pigmentos fueron realizados según lo descrito en la sección 2.4 del Capítulo 2 y las tasas de crecimiento fueron evaluadas de acuerdo con lo indicado en la sección 2.5.1 del mismo capítulo.

Los experimentos de citotoxicidad fueron realizados siguiendo lo descrito en la sección 2.5 del Capítulo 2 utilizando las cepas LPCc046 y LPCc047 en cuatro concentraciones ($1,2 \times 10^3$; $1,2 \times 10^2$; $1,2 \times 10^1$ y $1,2 \text{ cél. ml}^{-1}$ para LPCc046, y $1,9 \times 10^3$; $1,9 \times 10^2$; $1,9 \times 10^1$ y $1,9 \text{ cél. ml}^{-1}$ para LPCc047).

Para establecer el efecto de la temperatura y la salinidad en la tasa de crecimiento (μ) de las tres cepas, y para evaluar la potencia de ictiotoxicidad de las cepas LPCc045 y LPCc047, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías utilizando el programa Jamovi. La normalidad y homocedasticidad de varianza fueron probados con una prueba de Shapiro-Wilk y de Levene, respectivamente. Posteriormente, se realizó una prueba de Tukey para identificar las diferencias entre tratamientos. Para calcular la concentración media letal (LC50) de las dos cepas, se realizó un modelo log-logístico usando el paquete *drc* (Ritz *et al.*, 2015) luego de elegir el mejor modelo a partir de la función *mselect* del mismo paquete, en el software R utilizando la interfaz RStudio (R Core Team, 2022).

La medición del anión superóxido fue realizada siguiendo lo descrito en la sección 2.6 del Capítulo 2 utilizando las cepas LPCc046 y LPCc047.

4.3 – Resultados

4.3.1 Descripción morfológica

Las células de las cepas aisladas son de color marrón-amarillento, lanceoladas con una cola posterior corta (Fig. 4.1A-D), ovoides (Fig. 4.1E, F), obovoides (Fig. 4.1K, L), o casi globosas (Fig. 4.1G, H), y de formas intermedias (Fig. 4.1I, J). El largo celular es de 42,9 a 89,3 μm (promedio $68,4 \pm 9,6$), el ancho de 28,7 a 60,9 μm (promedio $42,0 \pm 6,9$) y la relación largo/ancho de 1,16 a 2,6 (promedio de $1,66 \pm 0,3$) ($n= 48$).

Las células son biflageladas, con flagelos subiguales en longitud, emergentes desde el fondo de una pequeña depresión ubicada en el extremo anterior (no mostrado).

La periferia celular comúnmente presenta dos tipos de gránulos: numerosos mucocistos en forma de botón (Fig. 4.1A,B,G,H, flechas) y pequeñas partículas más abundantes que los anteriores (Fig. 4.1H), ambos dispuestos por debajo de la plasmalema.

Los cloroplastos son numerosos, elipsoidales a discoidales, radialmente dispuestos dentro del ectoplasma vacuolado (Fig. 4.1C,I,L; Fig. 4.2A,B,D), con un pirenoide desnudo ubicado en el polo interno (Fig. 4.2A,B,D). La matriz del pirenoide es penetrada por tres tilacoides apilados que se separan en tilacoides aislados (Fig. 4.2B-D). El núcleo es ovalado (Fig. 4.2A) y está ubicado en el centro del endoplasma (Fig. 4.1A,C,E,F; Fig. 4.2A).

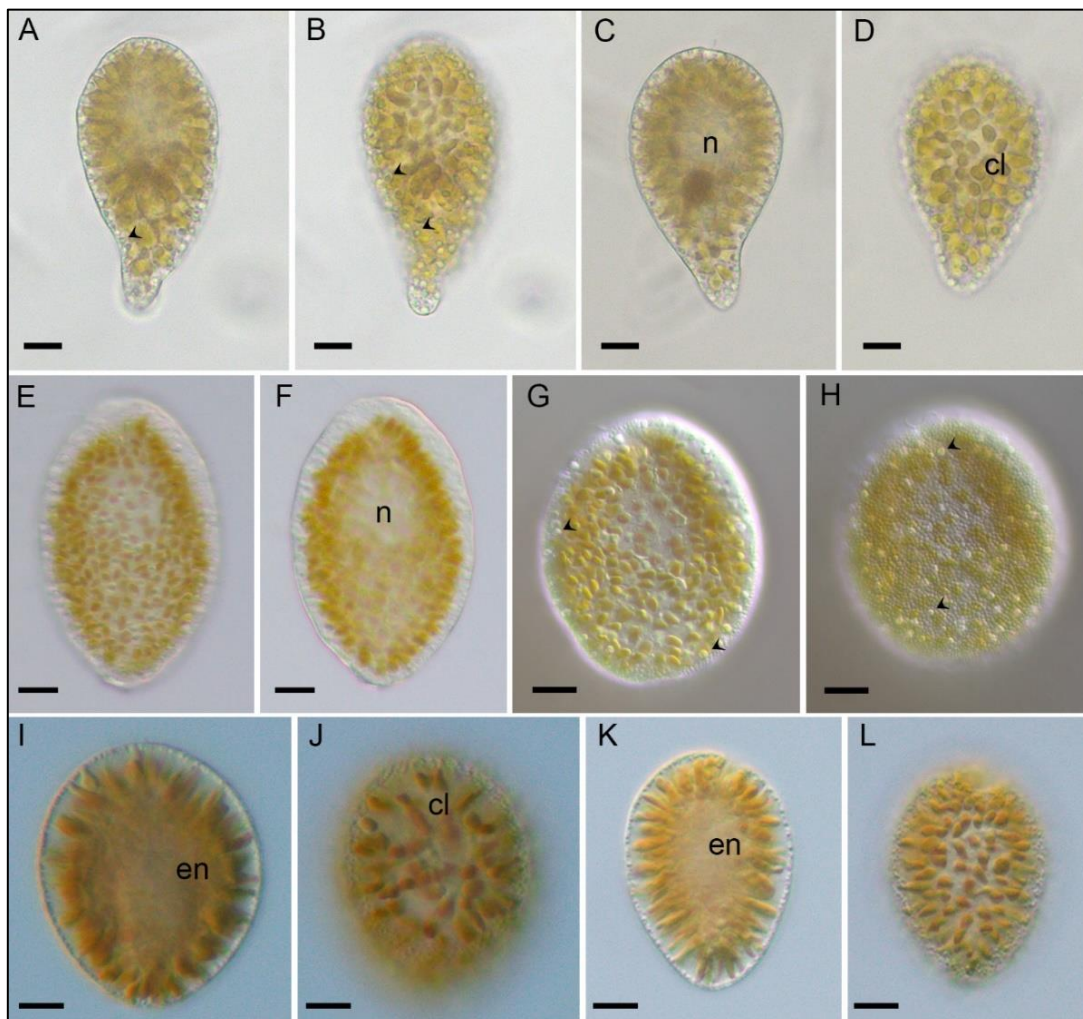


Fig. 4.1. Células de *Chattonella* en MO. **A-D**, cepa LPCc045 durante fase de crecimiento exponencial. Células lanceoladas con una cola posterior corta. Vista de la superficie donde se observan numerosos mucocistos con forma de botón (puntas de flecha). **E-H**, cepa LPCc046 durante fase de crecimiento exponencial. Células ovoides (**E-F**). Células no móviles casi globosas (**G-H**). Observación de dos tipos de gránulos, los mucocistos (flechas) y numerosas partículas pequeñas. **I-L**, cepa LPCc047 durante fase de crecimiento exponencial tardío. Formas intermedias (**I-J**) y células obovoides (**K-L**). Referencias, n = núcleo; en = endoplasma; cl = cloroplastos. Escala = 10 μm .

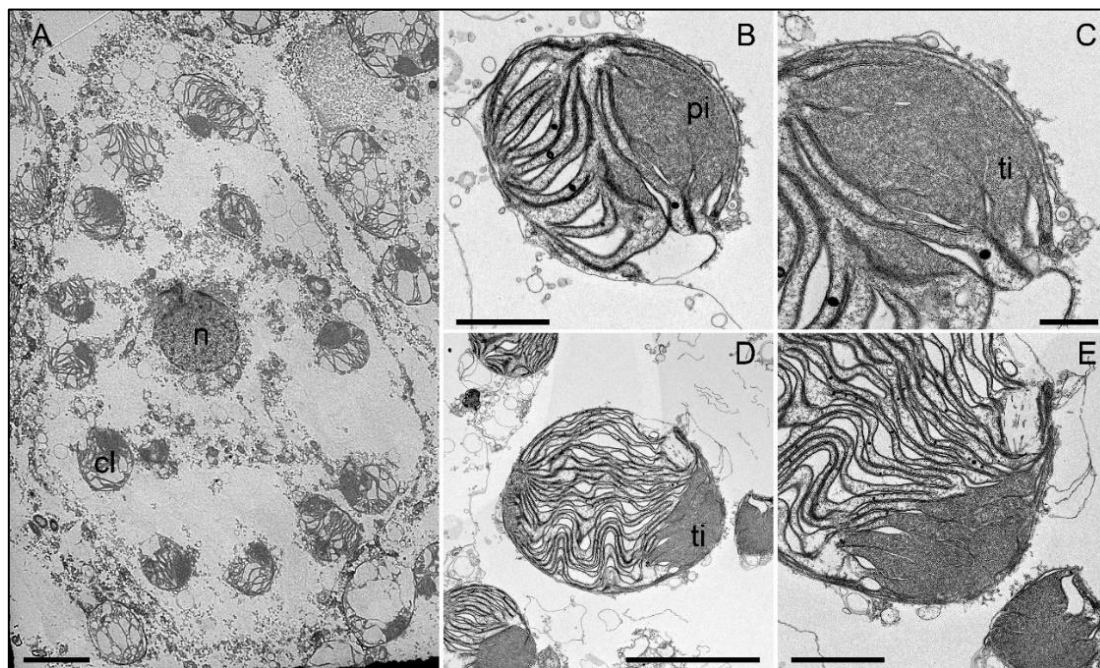


Fig. 4.2. Células la cepa LPCc047 bajo MET. **A**, sección longitudinal de la célula completa mostrando el núcleo (n) y cloroplastos periféricos (cl). **B, C**, cloroplasto con pirenoide (pi). **C, D**, detalle de la matriz del pirenoide penetrada por tres tilacoides apilados que se separan en tilacoides aislados (ti). Escalas = 10 μm (A), 5 μm (D), 2 μm (B, E), 500 nm (C).

4.3.2 Ocurrencia de *Chattonella* en la bahía Samborombón

El género *Chattonella* estuvo presente en el 11% de las 66 muestras obtenidas desde embarcación. El 72% de las muestras que contienen *Chattonella* fueron colectadas en verano, el 14% en primavera y el 14% en otoño. Sus densidades fluctuaron entre $0,04 \times 10^4$ y $0,1 \times 10^4$ cél. l^{-1} , con un promedio de $0,5 \times 10^4$ cél. l^{-1} . La temperatura promedio del agua al momento de las colectas fue de $19,9^\circ\text{C}$, con un mínimo de $13,9^\circ\text{C}$ y un máximo de $22,3^\circ\text{C}$, mientras que la salinidad promedio fue de 14,2, con un mínimo de 8,3 y un máximo de 29,0.

De las 82 muestras obtenidas desde la costa, *Chattonella* estuvo presente en un 5%, de las cuales el 50% fueron colectadas en verano, el 25% en primavera y el 25% en otoño. La densidad fluctuó entre $0,1 \times 10^4$ cél. l⁻¹ y $5,9 \times 10^4$ cél. l⁻¹, con un promedio de $0,9 \times 10^4$ cél. l⁻¹. El promedio de temperatura del agua al momento de las colectas fue de 21,2 °C, con un mínimo de 18,9 °C y un máximo de 23,6 °C, y el promedio de salinidad fue de 20,4 con un mínimo de 18,6 °C y un máximo de 24,0 °C. Como se ha visto en la sección 3.3.2.3.7 del Capítulo 3, un pico de biomasa fue registrado en una muestra de verano alcanzando 632,0 µg C l⁻¹. En esta ocasión, el género dominó la muestra en términos de biomasa (77% del total) al tratarse de células de gran tamaño (largo de 90 µm en promedio), y estuvo acompañada de diatomeas, clorofíceas, dinoflagelados, prasinofíceas y otras rafidofíceas (*Fibrocapsa japonica* y *Heterosigma akashiwo*). Sin embargo, no dominó en términos de abundancia, representando un 10% del total de taxas cuantificados. De la misma muestra se aisló la cepa LPCc046, cuyos datos de temperatura y salinidad pueden consultarse en la Tabla 4.1.

4.3.3 Filogenia

Los análisis de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana (MV e IB, respectivamente) mostraron la agregación de las tres secuencias argentinas en el clado del complejo *C. marina* con un porcentaje de Bootstrap de 99% y una probabilidad posterior bayesiana de 1 (Fig. 4.3). Entre todas las secuencias de este clado la distancia genética media neta (distancia-*p*) fue de 0,0008, siendo las secuencias LC721677 y LC711676 las más distantes, y entre las cepas argentinas la distancia-*p* fue de 0,0000.

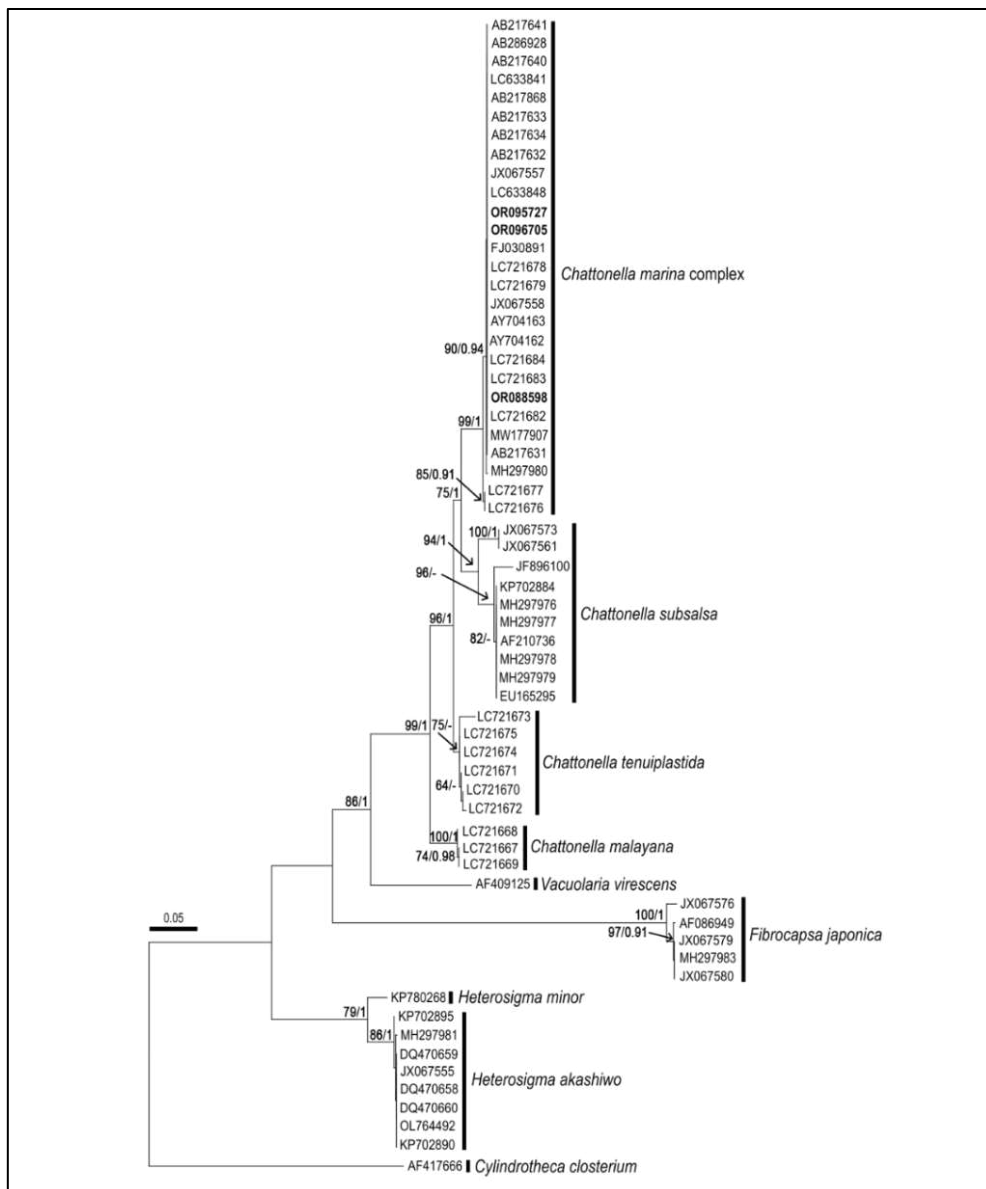


Fig. 4.3. Árbol de máxima verosimilitud (MV) a partir de la subunidad grande (LSU rADN) de las secuencias argentinas del complejo *Chattonella marina* y de especies relacionadas. En negrita se encuentran las secuencias analizadas en esta tesis. El soporte de las ramas se muestra como MV/Inferencia bayesiana (IB). Sólo se muestran los valores >60% (MV) o >0,6 (IB).

4.3.4 Análisis de pigmentos

Los análisis de HPLC realizados a las tres cepas argentinas del complejo *C. marina* mostraron que la clorofila-*a* fue el pigmento predominante, y se encontraron clorofila-*c2* y *c1* como pigmentos accesorios (Tabla 4.2). La fucoxantina (Fuc) fue el carotenoide más abundante en las tres cepas, y las diferencias se encontraron en las concentraciones de violaxantina (Viol), β -caroteno (β), zeaxantina (Zea) y anteraxantina (Ant). Sólo la

cepa LPCc047 presentó aloxantina (Alo) y diatoxantina (Dt) (Tabla 4.2). En contraste, las cepas LPCc045 y LPCc046 mostraron un pico en el tiempo de retención de diadinoxantina (Dd) y dinoxantina (Dn) (Tabla 4.2) pero debido a la metodología cromatográfica utilizada, no se ha podido distinguir a cuál de estos pigmentos corresponde, ni se ha podido cuantificar.

A pesar de que las tres cepas fueron cultivadas bajo las mismas condiciones, mostraron un patrón diferente en la composición y concentración pigmentaria. La cepa LPCc045 presentó mayor concentración de Chl- α , Chl-c2, Fuc, Viol, Ant, β y Zea que la cepa LPCc046 y LPCc047, y no presentó Chl-c1, que sí estuvo presente en las otras dos (Tabla 4.2). La cepa LPCc047, que mostró la menor concentración de pigmentos, presentó la mayor variedad de carotenoides (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Composición pigmentaria de las cepas del complejo *Chattonella marina* de Argentina. Los resultados se expresan en pg cél.⁻¹. Referencias, Chl- α , clorofila- α ; Chl-c1, clorofila-c1; Chl-c2, clorofila-c2; Fuc, fucoxantina; Viol, violaxantina; Alo, aloxantina; Ant, anteraxantina; Dd, diadinoxantina; Dt, diatoxantina; β , β -caroteno; Zea, zeaxantina; –, no detectado.

Cepa	Chl- α	Chl-c1	Chl-c2	Fuc	Viol	Alo	Ant	Dd	Dt	β	Zea
LPCc045	196,7	–	9,07	44,0	9,1	–	4,2	–	–	5,9	4,8
LPCc046	56,3	1,9	1,9	10,6	1,4	–	–	–	–	1,7	1,5
LPCc047	23,9	1,6	0,9	6,1	0,4	0,5	0,3	–	1,8	1,1	1,3

4.3.5 Tasas de crecimiento

La respuesta de las cepas bajo estudio ante las diferentes condiciones de temperatura y salinidad fue similar en términos de densidades máximas encontradas, sin embargo, el efecto en la tasa de crecimiento (μ) fue diferente. LPCc045 no presentó diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA, $p=0,71$). El rango μ para esta cepa varió entre $0,01 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$ y $0,41 \pm 0,03 \text{ d}^{-1}$, hallándose el máximo a $15 \text{ }^\circ\text{C}$ y salinidad de 25 (Tabla 4.3). La densidad celular máxima ($1,04 \times 10^4 \text{ cél. ml}^{-1}$) fue hallada a $18 \text{ }^\circ\text{C}$ y salinidad de 20. En cambio, la temperatura resultó significativa para LPCc046 (ANOVA, $p<0,01$) y la salinidad para LPCc047 (ANOVA, $p<0,01$), y en esta última, μ fue mayor a salinidad de 30 que a 20 ($p<0,01$, test de Tukey). El rango de μ varió entre $0,01 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$

¹ y $0,27 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$ para LPCc046 y entre $0,03 \pm 0,02 \text{ d}^{-1}$ y $0,70 \pm 0,14 \text{ d}^{-1}$ para LPCc047. En ambas cepas, la μ (Tabla 4.3) y la densidad celular máxima fue hallada a $18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y a salinidad de 30 ($1,06 \times 10^4$ y $1,04 \times 10^4 \text{ cél. ml}^{-1}$, respectivamente).

Tabla 4.3. Valores máximos de tasa de crecimiento (μ en d^{-1}) alcanzados por las cepas LPCc045, LPCc046 y LPCc047 en cada tratamiento. T, temperatura; S, salinidad.

Cepa	T 15 °C			T 18 °C		
	S 20	S 25	S 30	S 20	S 25	S 30
LPCc045	0,25	0,41	0,34	0,31	0,30	0,28
LPCc046	0,13	0,14	0,16	0,23	0,26	0,27
LPCc047	0,30	0,22	0,53	0,33	0,53	0,70

4.3.6 Experimentos con líneas celulares

La viabilidad de las líneas celulares RTgill–W1 después de 2 h de exposición a la cepa LPCc047 fue significativamente diferente entre tratamientos (intracelular y sobrenadante) y entre las diferentes concentraciones celulares (ANOVA, $p < 0,01$). La citotoxicidad más elevada de las líneas fue hallada en el tratamiento sobrenadante a la máxima concentración microalgal, reduciendo la viabilidad al 60% (Fig. 4.4). En contraste, la viabilidad ante la cepa LPCc046 no mostró diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA, $p = 0,18$). Sin embargo, fue diferente dependiendo de la densidad celular (ANOVA, $p < 0,01$), encontrándose menor viabilidad a mayor concentración de microalga. El efecto citotóxico de esta cepa fue bajo, manteniendo la viabilidad celular cercana al 80% (Fig. 4.5).

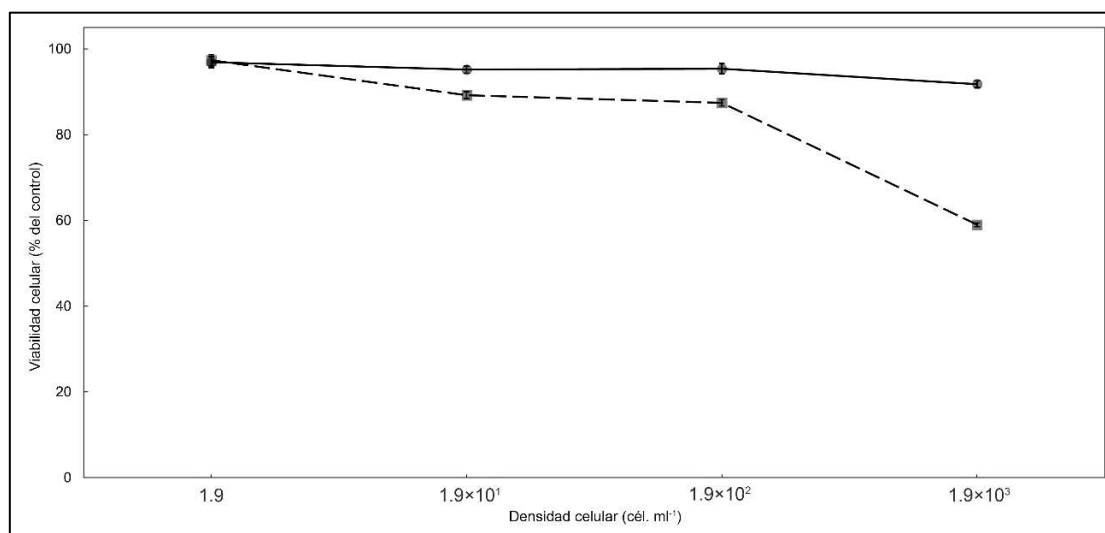


Fig. 4.4. Citotoxicidad de células lisadas (línea sólida) y sobrenadante (línea punteada) de la cepa LPCc047 contra las líneas celulares RTgill–W1. Los valores representan los promedios y las barras el error estándar de las cuatro réplicas.

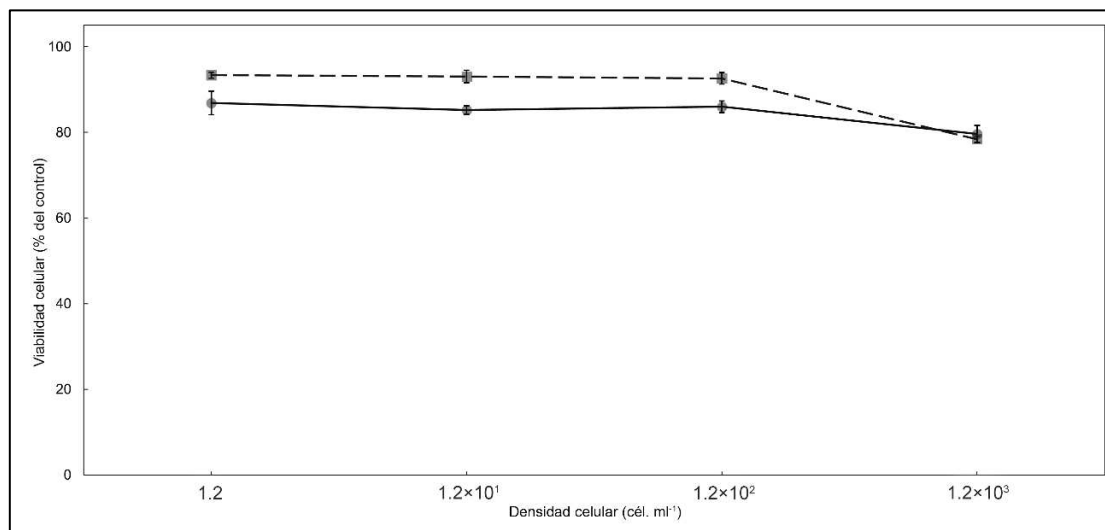


Fig. 4.5. Citotoxicidad de células lisadas (línea sólida) y sobrenadante (línea punteada) de la cepa LPCc046 contra las líneas celulares RTgill–W1. Los valores representan los promedios y las barras el error estándar de las cuatro réplicas.

Los valores de la concentración letal media (LC50) para la cepa LPCc047 fueron 4×10^3 cél. ml⁻¹ para el tratamiento sobrenadante y 7×10^5 cél. ml⁻¹ para el tratamiento intracelular, mientras que para la cepa LPCc046 los valores de LC50 fueron 1×10^6 cél. ml⁻¹ y 8×10^5 cél. ml⁻¹ (sobrenadante e intracelular, respectivamente).

4.3.7 Producción de anión superóxido

La producción del anión superóxido (O₂⁻) mostró una baja variabilidad entre las dos cepas (Tabla 4.4). Las células intactas (tratamiento sobrenadante) mostraron tasas más bajas de producción de O₂⁻ en comparación al tratamiento intracelular. La producción de superóxido en las cepas LPCc046 y LPCc047 fue de $7,6 \pm 0,7$ y $7,0 \pm 0,7$ pmol O₂⁻ cél.⁻¹ h⁻¹ en el tratamiento sobrenadante, y $8,1 \pm 0,6$ y $7,6 \pm 0,8$ pmol O₂⁻ cél.⁻¹ h⁻¹ en el tratamiento intracelular, respectivamente.

Tabla 4.4. Producción del anión superóxido (pmol O₂⁻ cél.⁻¹ h⁻¹) por dos cepas del complejo *C. marina* (LPCc046 y LPCc047) en tratamiento intracelular y sobrenadante.

	LPCc046		LPCc047	
	Tratamiento sobrenadante	Tratamiento intracelular	Tratamiento sobrenadante	Tratamiento intracelular
Producción de	6,9	7,5	7,1	7,8
superóxido	8,2	8,6	7,7	8,2
	7,8	8,2	6,3	6,7
Promedio	7,6	8,1	7,0	7,6
Error estándar	0,7	0,6	0,7	0,8

4.4 – Discusión

Este capítulo representa la primera caracterización morfológica, molecular, pigmentaria, fisiológica y citotóxica de cepas pertenecientes al complejo *Chattonella marina* provenientes de la bahía Samborombón y de aguas costeras bonaerenses. Las cepas determinadas en este estudio mediante análisis morfológicos y moleculares mostraron semejanza morfológica con las cepas analizadas por Band-Schmidt *et al.* (2004, Figs. 4-7, 12-33, como *C. marina* de bahía Concepción, Golfo de California, México), Branco *et al.* (2019, Fig. 3A-G, como *C. antiqua* del Sur de Bahía, Florianópolis, Brasil), y Lum *et al.* (2021, Fig. 4A-K; 2022, Fig. 6, Tabla 2, de Japón, Rusia, Indonesia y Malasia).

Lum *et al.* (2022) presentaron una comparación morfológica del complejo *C. marina* con las otras tres especies del género confirmadas por análisis moleculares (Lum *et al.*, 2022, Tabla 2) donde se puede observar que el rango de tamaño de todas las especies se superpone en mayor o menor medida, y la forma de la célula varía entre cepas de la misma especie e incluso dentro de la misma cepa bajo diferentes condiciones de cultivo (Band-Schmidt *et al.*, 2004; Demura *et al.*, 2009; Branco *et al.*, 2019; Lum *et al.*, 2022). A su vez, todas las especies comparadas presentan mucocistos (Lum *et al.*, 2021; Lum *et al.*, 2022) por lo que su presencia/ausencia no es un carácter confiable. De acuerdo con estos autores, las características morfológicas más útiles para diferenciar especies son la forma y el número de cloroplastos, y la manera en que los tilacoides penetran en la matriz del pirenoide. *Chattonella tenuiplastida* se caracteriza por presentar cloroplastos largos y delgados y *C. malayana* por tener cloroplastos en forma arriñonada en vista superficial. Sin embargo, los cloroplastos de las cuatro especies se

vuelven discooidales y redondeados en cultivos que se encuentran en fase estacionaria. Los cloroplastos observados en la sección longitudinal de células de estas especies (Lum *et al.*, 2022, Figs. 7E y 8E, respectivamente) muestran una forma similar (elíptica, discooidal e irregular con numerosos lóbulos) a los presentes en el complejo *C. marina* y en *C. subsalsa* (Lum *et al.*, 2022, Figs. 5E y 6E, respectivamente). El número de cloroplastos también se superpone entre especies (Lum *et al.*, 2022) por lo que no es considerado de valor taxonómico en la mayor parte de la literatura, y no resulta un carácter fiable para distinguirlas. La matriz del pirenoide se encuentra penetrada por tres tilacoides apilados que pueden separarse en tilacoides aislados en el complejo *C. marina* (Hara & Chihara, 1982, Figs. 11,12 para *C. antiqua* y Fig. 19 para *C. marina*; Lum *et al.*, 2022, Fig. 6F,G y este capítulo, Fig. 6.2B-D), *C. tenuiplastida* (Lum *et al.*, 2022, Fig. 7G,H) y *C. malayana* (Lum *et al.*, 2022, Fig. 8F-H). Por su parte, la matriz del pirenoide está penetrada por un único tilacoide en la cepa *C. subsalsa* estudiada por Klöppler *et al.* (2013, Figs. 14,15,18), Branco *et al.* (2019, Fig. 2A-C), Lum *et al.* (2022, Fig. 5F,G) y probablemente Tiffany *et al.* (2001, Fig. 1E, como *C. marina*). Esta característica parece ser útil para diferenciar a *C. subsalsa* de las otras especies del género, sin embargo, la cepa CCMP217 de *C. subsalsa* del Golfo de México presenta la matriz del pirenoide penetrada por tilacoides apilados (Klöppler *et al.*, 2013, Fig. 25). Asimismo, los detalles sobre la distribución de los tilacoides en la matriz del pirenoide de las tres especies restantes no parecen ser suficientes para establecer diferencias basadas en este carácter.

Las reconstrucciones filogenéticas han revelado consistentemente dos clados, el del complejo *C. marina* y el de *C. subsalsa* (Branco *et al.*, 2019; Lum *et al.*, 2021; Lum *et al.*, 2022). En este estudio, las secuencias argentinas se agruparon de forma robusta con las especies del complejo *C. marina* (99%/1), mostrando una baja distancia genética entre las secuencias de este clado. Estos resultados concuerdan con los reportados por Demura *et al.* (2009), Klöppler *et al.* (2013), Branco *et al.* (2019) y Lum *et al.* (2021; 2022), que demuestran falta de diversidad génica dentro del complejo *C. marina*. Adicionalmente, los análisis LSU realizados en el presente estudio posicionan al complejo *C. marina* como un grupo hermano de *C. subsalsa*, en concordancia con los resultados de Branco *et al.* (2019) y Lum *et al.* (2022).

En este estudio se analizaron los perfiles de pigmentos de cepas argentinas del

complejo *C. marina*, revelando que la clorofila-*a* es el principal en todas, consistente con lo reportado para cepas australianas, japonesas y mexicanas (Marshall & Newman, 2002; Band-Schmidt *et al.*, 2012). Estos perfiles también incluyeron pigmentos accesorios como clorofila-*c1* y *c2*, fucoxantina y violaxantina. Específicamente en las cepas argentinas, la fucoxantina fue el carotenoide más abundante (Tabla 4.2), a semejanza de lo reportado para las cepas australianas y japonesas (Marshall & Newman, 2002), aunque las concentraciones de fucoxantina y clorofila-*a* fueron notablemente más bajas en las primeras. Entre las cepas analizadas en este capítulo, LPCc047 presentó el perfil más completo, lo que indica una adaptabilidad potencialmente mayor o características fisiológicas particulares. La presencia constante de los pigmentos detectados en cepas provenientes de diferentes regiones geográficas respalda su uso como marcadores para el grupo. Sin embargo, la variabilidad en la concentración y la eventual ausencia de algunos sugiere que, si bien el perfil pigmentario puede ayudar a la identificación de especies, debe ser tomado con cautela y complementarse con análisis moleculares para realizar una determinación específica precisa. Adicionalmente, el enfoque integral asegura la correcta identificación y una mejor comprensión de la diversidad ecológica y fisiológica dentro de este género.

En este estudio, las tres tasas de crecimiento estudiadas resultaron diferentes entre sí, posiblemente debido a variaciones intraespecíficas fisiológicas entre las cepas. La μ máxima ($0,70 \text{ d}^{-1}$ en LPCc047, Tabla 4.3) fue mayor a la reportada por Marshall & Hallegraeff (1999, $0,47 \text{ d}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y salinidad de 30) y por Lum *et al.* (2023, $0,45 \text{ d}^{-1}$ a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ y salinidad de 25). A pesar de la mayor tasa de crecimiento, la densidad máxima encontrada en esta tesis fue de $1,06 \times 10^4 \text{ cél. ml}^{-1}$ para la cepa LPCc046 a $18 \text{ }^\circ\text{C}$ y salinidad de 30, notablemente menor a la máxima reportada por Marshall & Hallegraeff (1999) de $5 \times 10^4 \text{ cél. ml}^{-1}$ y por Lum *et al.* (2023) de $3 \times 10^4 \text{ cél. ml}^{-1}$ en condiciones similares. Estas discrepancias entre densidad y tasa de crecimiento podrían estar relacionadas con variables que no se han tenido en cuenta en este trabajo como la irradiancia, o con diferencias en los métodos de cultivo o el inóculo inicial en los experimentos. Además, el origen de las cepas juega un rol crítico. Mientras que las cepas argentinas provienen de aguas templadas del suroeste del océano Atlántico, las estudiadas por Marshall & Hallegraeff (1999) fueron aisladas de aguas cálidas del Índico y Pacífico de Australia y Japón, y la cepa estudiada por Lum *et al.* (2023) proviene de

aguas tropicales de Malasia. Estas diferencias ambientales probablemente contribuyan a las dinámicas de crecimiento en esta especie. En este sentido, a partir de los ensayos realizados en este estudio se pudo observar que las cepas argentinas, al igual que las de otras regiones, presentaron adaptabilidad a distintos rangos de temperatura y salinidad, lo que explica en parte la amplia distribución de *C. marina* (Khan *et al.*, 1995; Lum *et al.*, 2023). Aunque los análisis moleculares son cruciales para la identificación de esta especie, comprender la dinámica de crecimiento bajo distintas condiciones ambientales es esencial para entender su éxito ecológico y distribución, y conocer los rangos que pueden favorecer una floración.

Este trabajo muestra la primera evidencia del potencial ictiotóxico del complejo *C. marina* de Argentina. Entre las cepas estudiadas, solo LPCc047 mostró una citotoxicidad significativa a partir del tratamiento sobrenadante, reduciendo la viabilidad celular al 60% a la máxima concentración celular ($1,9 \times 10^3$ cél. ml⁻¹). Estos resultados contrastan con los obtenidos por Dorantes-Aranda (2012) y Dorantes-Aranda *et al.* (2013, 2015), quienes observaron que ambos tratamientos (sobrenadante e intracelular) afectaban la viabilidad de las líneas celulares. Una posible explicación para las diferencias en citotoxicidad es que las densidades celulares utilizadas en esos estudios fueron mayores que en el presente.

Se han propuesto distintos mecanismos para explicar la ictiotoxicidad de esta rafigidofícea, y se cree que *C. marina* causa mortandad de peces al asfixiarlos mediante daño en el tejido branquial con las especies reactivas de oxígeno (ROS) desempeñando un papel significativo en esta lesión (Kim & Oda, 2010). En este trabajo, la producción del anión superóxido fue similar entre los tratamientos y se observaron valores más elevados que los reportados para la cepa ARC260 por Díaz *et al.* (2018), pero inferiores a los documentados por Dorantes-Aranda *et al.* (2013) para las cepas CMPL01 y N-118. Diversos estudios indican que la producción de ROS ocurre en el glicocálix que rodea a las células, ya que presenta un sistema continuo de producción de O₂⁻ (Cho *et al.*, 2022). La centrifugación de los cultivos para preparar el tratamiento sobrenadante puede haber desencadenado la liberación del glicocálix y esto explicaría parcialmente la mayor citotoxicidad. Sin embargo, la producción de ROS fue similar entre los tratamientos (sobrenadante e intracelular) y entre las cepas (Tabla 4.4).

Aunque Ishimatsu *et al.* (1996) encontraron una correlación entre la producción

de ROS y la ictiotoxicidad de *C. marina*, los efectos tóxicos de las ROS se consideran indirectos o sinérgicos con otros factores. Por ejemplo, en varias especies de microalgas, incluyendo el complejo *C. marina*, se ha encontrado que las ROS potencian la toxicidad de algunos productos de peroxidación lipídica como los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) (Arzul *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999; Jenkinson & Arzul, 2001; Marshall *et al.*, 2003, 2005; Mardones *et al.* 2015). Marshall *et al.* (2003) demostraron un aumento en la ictiotoxicidad de cepas de *Chattonella* a partir de reacciones sinérgicas entre ácidos grasos libres (FFA, por sus siglas en inglés) y ROS.

Dado que los mecanismos exactos que subyacen a la ictiotoxicidad de este grupo aún no se comprenden completamente, comparar valores de LC50 puede ofrecer información relevante sobre la toxicidad relativa entre especies que producen FAN. Por ejemplo, la cepa LPCc047 mostró mayor toxicidad en el tratamiento sobrenadante que la cepa N-118 de Japón (Dorantes-Aranda, 2012) (Fig. 4.6). Además, fue más tóxica a concentraciones más bajas respecto a otras cepas sudamericanas como *Alexandrium catenella* K7, *Heterosigma akashiwo* CREAN-HA03 y *Pseudochattonella verruculosa* ARC498 (Fig. 4.6). Es importante destacar que estas comparaciones son preliminares, ya que la citotoxicidad puede variar significativamente con las condiciones experimentales como el medio de cultivo, la densidad celular y las fases de crecimiento. Teniendo esto en cuenta, al comparar las cepas LPCc047 y N-118 (Dorantes-Aranda *et al.*, 2013), la producción de ROS sobrenadante fue ligeramente inferior en la cepa argentina, pero la toxicidad contra RTgill-W1 fue mayor. Esto sugiere que, aunque las ROS desempeñan un papel fundamental en la toxicidad de *C. marina* (Cho *et al.*, 2022), es necesario identificar otros metabolitos secundarios que pueden estar contribuyendo a la ictiotoxicidad.

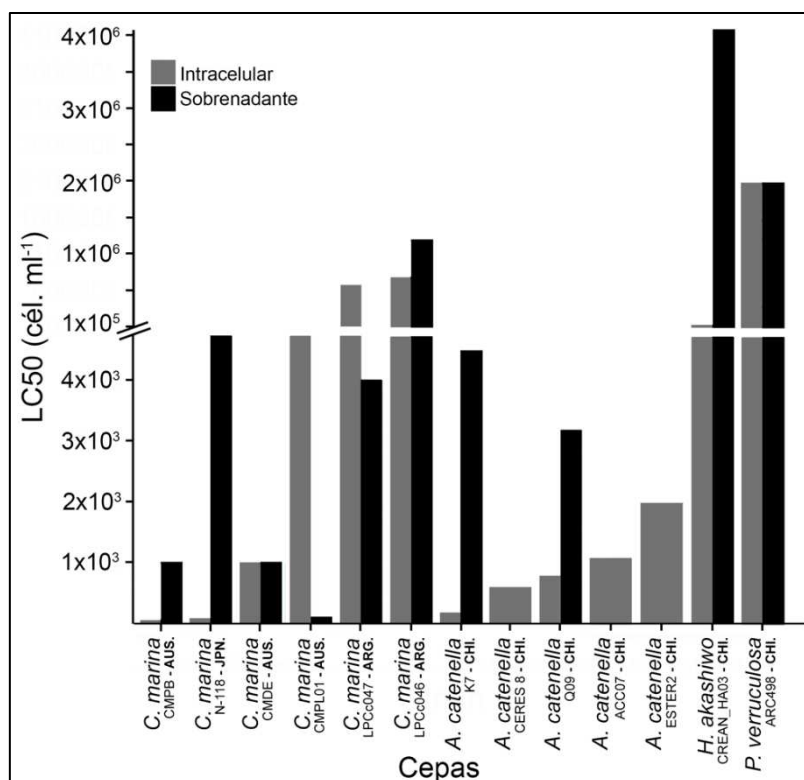


Fig. 4.6. Comparación de los valores de concentración letal media (LC50, en cél. ml^{-1}) obtenidos de los ensayos citotóxicos con RTgill-W1 para los tratamientos intracelular (gris) y sobrenadante (negro) en cepas de *C. marina* (LPCc046 y LPCc047 este estudio; CMPB, N-118, CMDE, CMPL01, Dorantes-Aranda, 2012) y otras cepas sudamericanas de *Alexandrium catenella* (K7, CERES 8, Q09, ACC07, Mardones *et al.*, 2015), *Heterosigma akashiwo* (CREAN_HA03, Flores-Leñero *et al.*, 2022) y *Pseudochattonella verruculosa* (ARC498, Mardones *et al.*, 2019). El país de origen de cada cepa se indica en negrita bajo de su nombre. ARG, Argentina; AUS, Australia; CHI, Chile; JPN, Japón. Las líneas horizontales paralelas en el eje y indican interrupciones en el mismo.

A pesar de que *Chattonella marina* fue citada en Argentina por Sunesen *et al.* (2021), este es el primer registro del complejo *C. marina* con soporte filogenético. *Chattonella antiqua* (perteneciente al complejo *C. marina*) y *C. subsalsa* fueron reportadas para aguas brasileñas a partir de un trabajo que combina análisis morfológicos y filogenéticos (Branco *et al.* 2019) y a partir del presente estudio la distribución del complejo *C. marina* es extendida hacia aguas más templadas del Océano Atlántico Sudoccidental. En el mismo sentido, Lum *et al.* (2023) estableció que en Asia, mientras las cuatro especies de *Chattonella* (*C. marina*, *C. subsalsa*, *C. malayana* y *C. tenuiplastida*) coexisten en aguas tropicales, *C. marina* es la única detectada en aguas templadas.

Capítulo 5

Fibrocapsa japonica

5.1 – Introducción

El género *Fibrocapsa* S.Toriumi & H.Takano, perteneciente a la Clase Raphidophyceae, es monotípico y su única especie, *Fibrocapsa japonica* Toriumi & Takano, se caracteriza por presentar células desnudas, dos flagelos desiguales heterodinámicos que emergen de una depresión anterior, numerosos cloroplastos amarillo-amarronados y mucocistos en la parte posterior de la célula (Hara & Chihara, 1985). Al igual que otras rafdofíceas, el registro de esta especie es difícil debido a que sus células frágiles no se conservan adecuadamente con los fijadores convencionales para muestras de fitoplancton (Klöpper *et al.*, 2008; Band-Schmidt *et al.*, 2012; Branco *et al.*, 2019). Sin embargo, *F. japonica* es más sencilla de identificar con microscopía óptica en muestras de fitoplancton *in vivo* por su tamaño y características morfológicas (Band-Schmidt *et al.*, 2012), como el conspicuo grupo de mucocistos presentes en el extremo posterior de la célula.

Estudios moleculares basados en la región del espaciador transcrito interno (ITS) realizados en cepas de *F. japonica* de Alemania, Australia, Japón, Países Bajos y Nueva Zelanda sugieren que esta especie forma una única población cosmopolita con un alto polimorfismo genético posiblemente debido a la hibridación entre especies parentales con haplotipos diferentes, originalmente provenientes de poblaciones aisladas y reunidas por el transporte de agua de lastre (Kooistra *et al.*, 2001). Más tarde, Cucchiari *et al.* (2008) y Klöpper *et al.* (2008) estudiaron las regiones ITS y los genes *psaA* en cepas italianas, encontrando un clado separado de las estudiadas por Kooistra *et al.* (2001), e interpretaron que este endemismo podría significar la existencia de una nueva especie críptica. Asimismo, Branco *et al.* (2019) identificaron diferencias geográficas intraespecíficas a partir del análisis de la subunidad grande del ADN ribosómico (LSU rADN) en una cepa brasileña, que se agrupó junto a cepas japonesas, australianas y alemanas, separándose del clado formado por las cepas italianas.

Fibrocapsa japonica es considerada una especie euriterma ya que puede crecer en un amplio rango de temperatura (entre 9,5 y 32 °C; de Boer *et al.*, 2004; de Boer *et*

al., 2005). Si bien se ha demostrado una preferencia por las temperaturas más cálidas (de Boer *et al.*, 2005; Cucchiari *et al.*, 2008), de Boer *et al.* (2005) estudiaron cepas provenientes de diferentes regiones climáticas (Alemania, Japón y Nueva Zelanda), y observaron que la procedente de Nueva Zelanda estaba mejor adaptada a condiciones mayormente templado-frías que el resto de las analizadas. En cuanto a la salinidad, *F. japonica* puede tolerar diferentes rangos, con óptimos diferenciales entre cepas de distintas regiones (de Boer *et al.*, 2004; Cucchiari *et al.*, 2008). La tolerancia de las especies a distintas variables ambientales como las mencionadas anteriormente, puede indicar qué tan bien adaptada está una cepa a las condiciones locales, y, en consecuencia, explicar o predecir floraciones (de Boer *et al.*, 2005).

La distribución de *F. japonica* es cosmopolita y ha sido reportada en Países Bajos (Vrieling *et al.*, 1995), Australia y Nueva Zelanda (Chang *et al.*, 1995, Rhodes *et al.*, 2003), Estados Unidos (Loeblich & Fine, 1977; Smayda & Villareal, 1989; Tomas, 1998), Francia (Billard, 1992), Italia (Cucchiari *et al.*, 2008), Japón (Okaichi, 1972) y México (Band-Schmidt *et al.*, 2004). En Sudamérica la especie ha sido registrada en Brasil, Uruguay y Argentina (Odebrecht & Abreu, 1995; Méndez *et al.*, 2013; Branco *et al.*, 2019; Sunesen *et al.*, 2021 y referencias ahí).

Como se comentó en la Introducción del Capítulo 4 (sección 4.1) de la presente tesis, las rafidofíceas marinas son relevantes en los programas de monitoreo debido a que algunas especies son ictiotóxicas y pueden producir mortandad masiva de peces cultivados o silvestres. Las floraciones algales nocivas (FAN) producidas por *F. japonica* han sido asociadas a episodios de grandes mortandades de peces con cuantiosas pérdidas económicas en Japón (Toriumi & Takano, 1973; Okaichi, 1989). La ictiotoxicidad de esta especie ha sido atribuida a diversos factores. Por un lado, a la eyección de sus mucocistos con la consecuente producción de mucus capaz de obstruir las branquias y producir hipoxia o asfixia a los peces (Fu *et al.*, 2003; de Boer *et al.*, 2005), sin embargo, esta hipótesis fue descartada a partir de los ensayos realizados por de Boer *et al.* (2012) en larvas de lenguado común (*Solea solea*). Como ocurre en otras especies de esta Clase, la ictiotoxicidad puede ser debida a la producción de neurotoxinas similares a las brevetoxinas (Khan *et al.*, 1996b; Bridgers *et al.*, 2004), a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Oda *et al.*, 1997) y de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) (Marshall *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2004). Según de Boer *et al.* (2009) es posible que la

ictiotoxicidad se deba a la combinación entre PUFAs y compuestos hemolíticos cuya intensidad es dependiente de la luz, mientras que Dorantes-Aranda *et al.* (2015) sugieren que la sinergia entre ROS y PUFAs genera compuestos desconocidos implicados en la citotoxicidad a través de una peroxidación lipídica.

Dada la importancia de la bahía Samborombón como área de cría de peces de interés económico para Argentina, el objetivo de este capítulo es brindar la primera caracterización morfológica, filogenética, pigmentaria, fisiológica y citotóxica de cepas de *F. japonica* provenientes de aguas costeras del área de estudio.

5.2 – Metodología

Cuatro cepas pertenecientes a *Fibrocapsa japonica* (LPCc048, LPCc049, LPCc050 y LPCc051) fueron aisladas a partir de las muestras LPC 13715, LPC 13727, LPC 13732 y LPC 13734, respectivamente, colectadas en Tapera de López (LPCc048, LPCc049, LPCc051) y General Lavalle (LPCc050). La metodología seguida para la toma de muestras y el aislamiento de cepas se describe en la sección 2.1.2 y 2.2.1 del Capítulo 2 (Materiales y Métodos). Con el objetivo de complementar este trabajo, se incluyó una cepa de la misma especie (LPCc058) aislada de la muestra LPC 11471, proveniente de Santa Teresita. Las fechas y sitios de colecta, variables ambientales y código de acceso al GenBank se resumen en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Datos generales sobre las cinco cepas de *Fibrocapsa japonica* aisladas.

Cepa	Sitio de muestreo y código de herbario	Temperatura y salinidad del agua	Fecha	Aislador	Número de acceso GenBank
LPCc048	Tapera de López	21,5 °C	15/03/2020	Aguiar	OR498773
	LPC 13715	18,9		Juárez D.	
LPCc049	Tapera de López	23,6 °C	28/02/2021	Aguiar	OR498774
	LPC 13727	20,0		Juárez, D.	
LPCc050	General Lavalle	20,6 °C	29/03/2021	Aguiar	OR498775
	LPC 13732	15,9		Juárez, D.	
LPCc051	Tapera de López	23,0 °C	18/04/2021	Aguiar	OR498776
	LPC 13734	20,8		Juárez, D.	
LPCc058	Santa Teresita	23,0 °C	02/02/2017	Sunesen, I.	OR514481
	LPC 11471	20,7			

El análisis morfológico fue realizado según lo descrito en las secciones 2.2.2.3 para microscopía óptica (MO) y 2.2.2.5 para microscopía electrónica de transmisión (MET) del Capítulo 2, mientras que el análisis cuantitativo se efectuó según lo indicado en la sección 2.2.3 del mismo.

Los análisis filogenéticos se llevaron a cabo según lo detallado en la sección 2.3 del Capítulo 2, utilizando 700 pares de bases y datos de secuencias disponibles en GenBank (Anexo 5, Capítulo 9). Para enraizar el árbol de máxima verosimilitud se utilizó una secuencia de la diatomea *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & J.C. Lewis.

Los análisis de pigmentos se realizaron, por cuestiones metodológicas, únicamente en la cepa LPCc049 según lo descrito en la sección 2.4 del Capítulo 2, y las tasas de crecimiento se evaluaron conforme a lo indicado en la sección 2.5.1 del mismo capítulo.

Los experimentos de citotoxicidad se efectuaron según lo descrito en la sección 2.5.2 del Capítulo 2 utilizando las cepas LPCc049 y LPCc051 en cinco concentraciones ($6,1 \times 10^3$; $6,1 \times 10^2$; $6,1 \times 10^1$; $6,1$ y $0,61$ cél ml.⁻¹ para LPCc049 y $1,3 \times 10^4$; $1,3 \times 10^3$; $1,3 \times 10^2$; $1,3 \times 10^1$; $1,3$ cél ml.⁻¹ para LPCc051).

La evaluación del efecto de la temperatura y la salinidad en la tasa de crecimiento (μ) de las cepas LPCc049 y LPCc051, así como la determinación del potencial citotóxico de ambas, se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías. La normalidad y homocedasticidad de las varianzas se verificaron mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Posteriormente, se aplicó la prueba de Tukey para identificar diferencias entre los tratamientos. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Jamovi. El cálculo de la concentración media letal (LC50) de las dos cepas se realizó a partir de un modelo log-logístico utilizando el paquete *drc* (Ritz *et al.*, 2015) luego de elegir el mejor modelo usando la función *mselect* del mismo paquete, en el software R mediante la interfaz RStudio (R Core Team, 2022).

5.3 – Resultados

5.3.1 Análisis morfológico

Las células son de color pardo-amarillento, con forma ovalada a elíptica (Fig. 5.1B,C),

pudiendo ser redondeadas (no se muestra) o subrectangulares en la fase de crecimiento estacionaria (Fig. 5.1F). El largo celular es de 19,8 a 36,1 μm (promedio 27,4 \pm 0,8), el ancho de 15,5 a 29,1 μm (promedio 19,4 \pm 0,7) y la relación largo ancho de 1,0 a 1,7 (promedio de 1,4 \pm 0,0) (n = 51). Durante la fase de crecimiento exponencial, las células tienden a agregarse en cadenas de mucus (Fig. 5.1A).

Las células son biflageladas, con un flagelo dirigido anteriormente, ondulante durante la natación (Fig. 5.1B,D, flechas), y otro dirigido posteriormente (Fig. 5.1D flechas), ambos emergentes de una depresión en la parte anterior de la célula (Fig. 5.1B,D).

La región posterior de la célula presenta numerosos mucocistos naviculoides (Fig. 5.1C,F), mientras que el núcleo se localiza en la región central del endoplasma (Fig. 5.1C). Los mucocistos eyectan largos hilos de mucus al exterior de la célula (Fig. 5.1E, flechas negras).

Los cloroplastos, elipsoidales a discoidales, son numerosos y están dispuestos radialmente en el ectoplasma (Fig. 5.1B,F; Fig. 5.2A, cl). Las lamelas cloroplásticas son bitilacoidales (Fig. 5.2B) y penetran el pirenoide (Fig. 5.2C, pi).

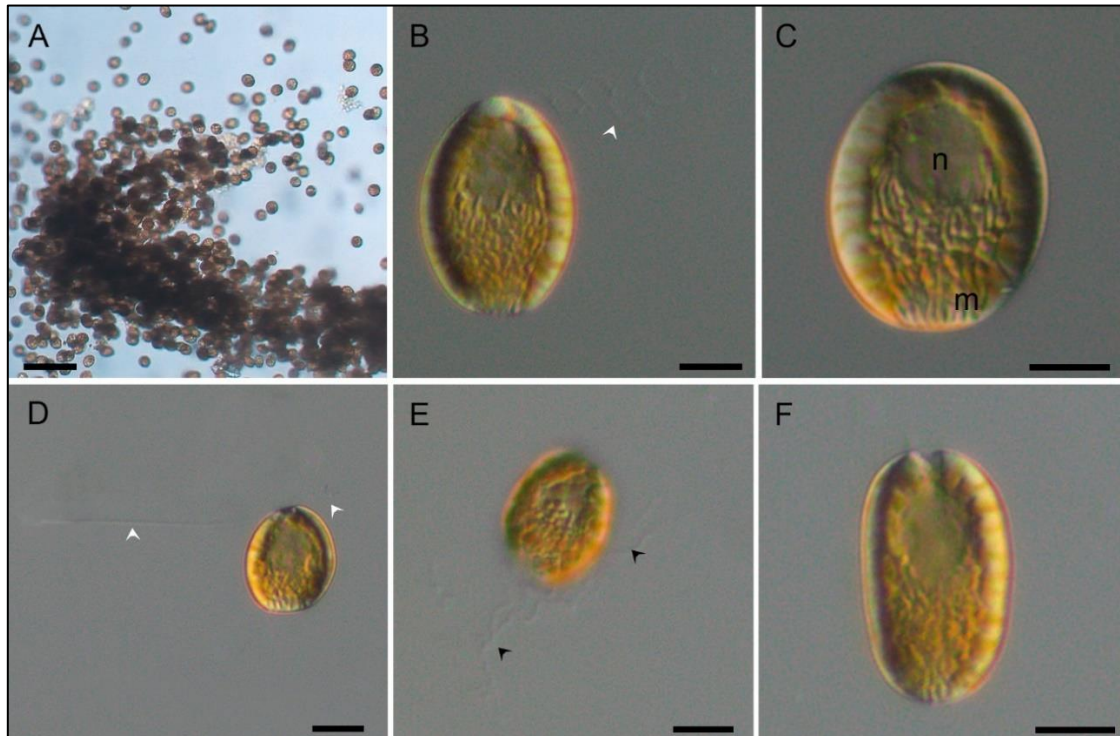


Fig. 5.1. Células de *Fibrocapsa japonica* bajo MO. **A-C**, cepa LPCc048; **D-E**, cepa LPCc050. **A**, agregaciones celulares. **B**, célula durante fase de crecimiento exponencial mostrando el flagelo anterior (flecha blanca). **C**, célula mostrando núcleo (n) y mucocistos (m). **D**, célula durante crecimiento exponencial, mostrando

dos flagelos (flecha blanca). **E**, célula durante la fase de crecimiento exponencial mostrando mucocistos eyectados (flecha negra). **F**, célula durante la fase de crecimiento estacionaria. Escala = 50 μm (A), 10 μm (B, C, D, F, E).

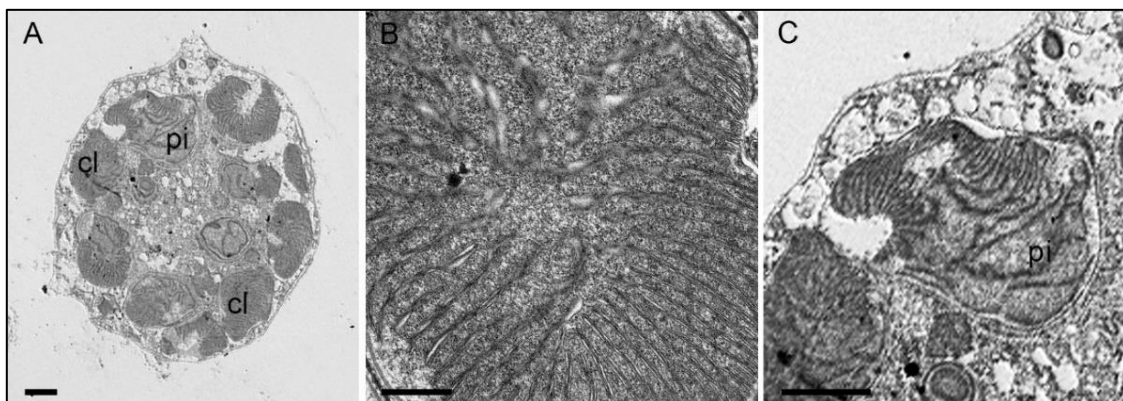


Fig. 5.2. Células de *Fibrocapsa japonica* bajo MET. **A**, sección longitudinal de la célula completa mostrando cloroplastos periféricos (cl) y cloroplasto con pirenoide (pi). **B**, detalle del cloroplasto, note lamelas bitilacoidales. **C**, detalle de cloroplasto con pirenoide (pi) ubicado en la parte anterior y dirigido hacia el centro de la célula. Escala= 2 μm (A, C), 500 nm (B).

5.3.2 Ocurrencia de *Fibrocapsa* en la bahía Samborombón

Fibrocapsa japonica estuvo presente en el 9% de las muestras obtenidas desde la costa y no se detectó en los muestreos realizados desde embarcación. El 43% de las muestras con presencia de la especie se colectaron en otoño, mientras que el resto se distribuyó equitativamente entre primavera y verano. La abundancia celular osciló entre $0,04 \times 10^4$ y $5,8 \times 10^4$ cél. l^{-1} , con un promedio de $1,7 \times 10^4$ cél. l^{-1} .

El agua al momento de la colecta de las muestras en que *F. japonica* fue hallada presentaba una temperatura promedio de 21,8 °C, con un mínimo de 19,7 °C y un máximo de 23,6 °C, y una salinidad promedio de 18,9, con un mínimo de 11,5 y un máximo de 24,0.

5.3.3 Filogenia

Los análisis de máxima verosimilitud (MV) y de inferencia bayesiana (IB) presentaron resultados similares, agrupando las secuencias correspondientes a las cinco cepas argentinas en el clado de *Fibrocapsa japonica* con soporte de Bootstrap de 99% y una probabilidad posterior bayesiana de 1 (Fig. 5.3).

La distancia genética media neta (distancia- p) entre todas las secuencias del clado fue de 0,01, y la distancia entre las secuencias argentinas estuvo entre 0,00000 y 0,007. La secuencia OR498775, correspondiente a la cepa LPCc050, presentó la mayor distancia entre las cepas argentinas. En el análisis MV, esta secuencia formó un grupo hermano del resto de las *F. japonica* incluidas (Fig. 5.3), mientras que en el análisis de IB se agrupó con la secuencia MW774086 proveniente de Estados Unidos, con una probabilidad posterior bayesiana menor al 0,07.

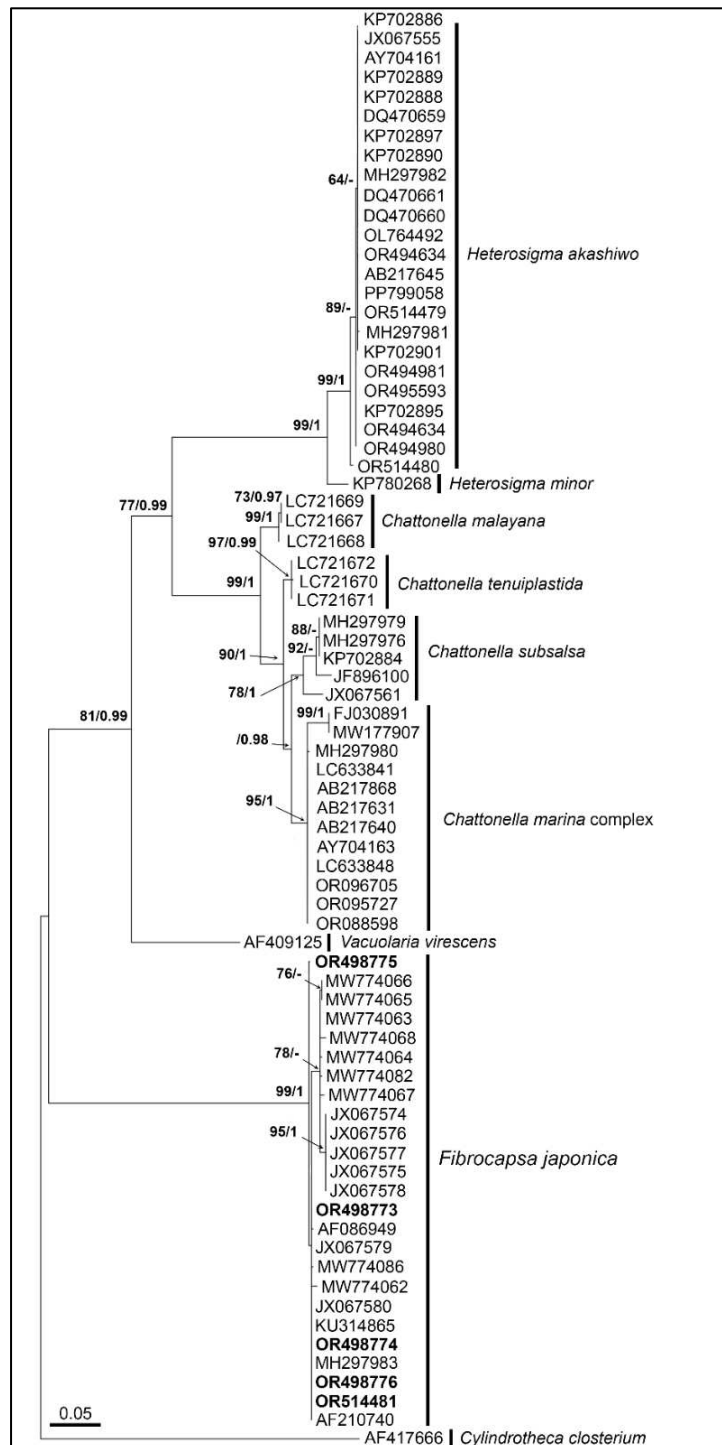


Fig. 5.3. Árbol de máxima verosimilitud (MV) a partir de la subunidad grande (LSU rADN) de las secuencias argentinas de *F. japonica* y de especies relacionadas. En negrita se encuentran las secuencias correspondientes a las cepas argentinas. El soporte de las ramas se muestra como MV/Inferencia bayesiana (IB). Sólo se muestran los valores >60% (MV) o >0,6 (IB).

5.3.4 Análisis de pigmentos

El análisis de HPLC de la cepa LPCc049 mostró que la clorofila-*a* fue el pigmento predominante, acompañada por clorofila-*c2* y clorofila-*c1* como pigmentos accesorios (Tabla 5.2). La fucoxantina fue el carotenoide más abundante, seguido por violaxantina, anteraxantina, β -caroteno y zeaxantina (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Composición pigmentaria de la cepa LPCc049. Los resultados se expresan en $\mu\text{g c\acute{e}l.}^{-1}$. Referencias, Chl-*a*, clorofila-*a*; Chl-*c1*, clorofila-*c1*; Chl-*c2*, clorofila-*c2*; Fuc, fucoxantina; Viol, violaxantina; Ant, anteraxantina; β , β -caroteno; Zea, zeaxantina.

Chl- <i>a</i>	Chl- <i>c1</i>	Chl- <i>c2</i>	Fuc	Viol	Ant	β	Zea
62,3	4,8	7,6	38,4	2,7	1,1	0,9	0,6

5.3.5 Tasas de crecimiento

Las densidades máximas de las cepas LPCc049 y LPCc051 en distintas condiciones de temperatura y salinidad fueron similares, alcanzándose los valores más altos a 18 °C y salinidad de 30 ($3,6 \times 10^4$ c\acute{e}l. ml^{-1} para LPCc049 y $2,9 \times 10^4$ c\acute{e}l. ml^{-1} para LPCc051). Sin embargo, la respuesta de μ fue diferente entre cepas. En el caso de LPCc049, la temperatura fue un factor significativo (ANOVA, $p < 0,01$), donde μ osciló entre $0,06 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$ y $1,22 \pm 0,1 \text{ d}^{-1}$, encontrándose el máximo a 15 °C y 25 de salinidad (Tabla 5.3), mientras que la salinidad no resultó significativa (ANOVA, $p = 0,68$). Para la cepa LPCc051 la salinidad fue significativa, con μ siendo mayor a 30 que a 20 de salinidad ($p < 0,01$, test de Tukey), mientras que la temperatura resultó parcialmente significativa (ANOVA, $p = 0,04$). El rango de μ para esta cepa varió entre $0,01 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$ y $0,36 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$, hallándose el máximo a 15 °C y 25 de salinidad (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Valores máximos de tasa de crecimiento (μ en d^{-1}) alcanzados por las cepas LPCc049 y LPCc051 en cada tratamiento. T: temperatura, S: salinidad.

Cepa	T 15 °C			T 18 °C		
	S 20	S 25	S 30	S 20	S 25	S 30
LPCc049	1,09	1,22	0,79	0,73	0,81	0,98
LPCc051	0,25	0,36	0,28	0,29	0,22	0,30

5.3.6 Experimentos con líneas celulares

La viabilidad de las líneas celulares RTgill–W1 después de 2 h de exposición a las cepas LPCc049 y LPCc051 mostró diferencias significativas entre los tratamientos (intracelular y sobrenadante) y entre las diferentes concentraciones celulares (ANOVA, $p < 0,01$).

La cepa LPCc049 resultó la más citotóxica, con las concentraciones $6,1 \times 10^3$ cél. ml^{-1} y $6,1 \times 10^2$ cél. ml^{-1} siendo significativamente diferentes del resto ($p < 0,01$, test de Tukey). El tratamiento sobrenadante fue el más tóxico, reduciendo la viabilidad celular al 53%, mientras que el tratamiento intracelular la redujo al 68% en la máxima concentración celular utilizada (Fig. 5.4).

En la cepa LPCc051 las concentraciones de $1,3 \times 10^3$ cél. ml^{-1} y $1,3 \times 10^4$ cél. ml^{-1} fueron significativamente diferentes del resto ($p < 0,01$, test de Tukey) y el tratamiento intracelular fue el más citotóxico (ANOVA, $p < 0,01$), reduciendo la viabilidad celular al 61% en la máxima concentración. El tratamiento sobrenadante redujo la viabilidad al 70%, y sólo la concentración más alta fue significativamente diferente al resto ($p < 0,01$, test de Tukey) (Fig. 5.5).

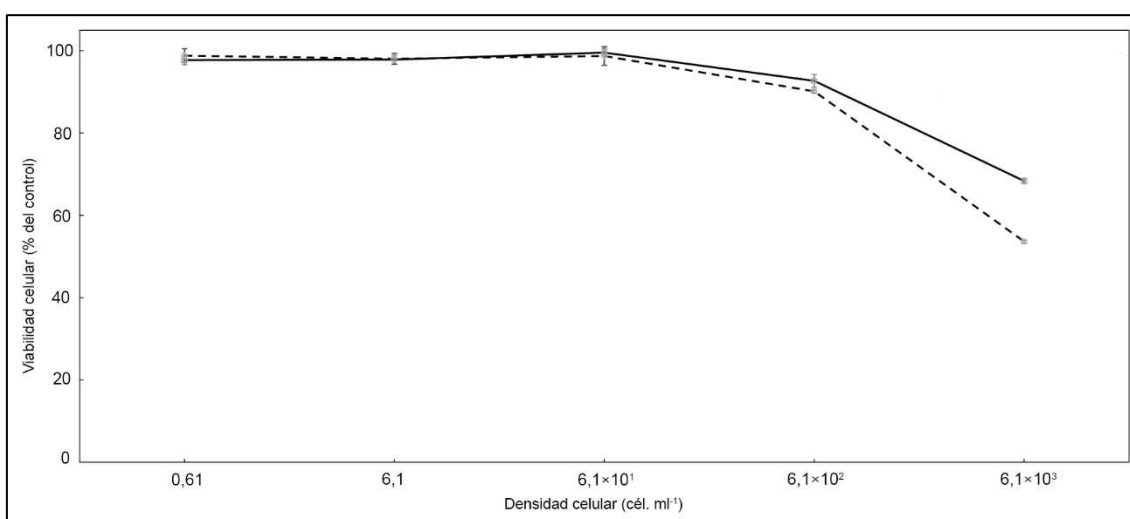


Fig. 5.4. Citotoxicidad de células lisadas (línea sólida) y sobrenadante (línea punteada) de la cepa LPCc049 contra las líneas celulares RTgill–W1. Los valores representan los promedios y las barras el error estándar

de las cuatro réplicas.

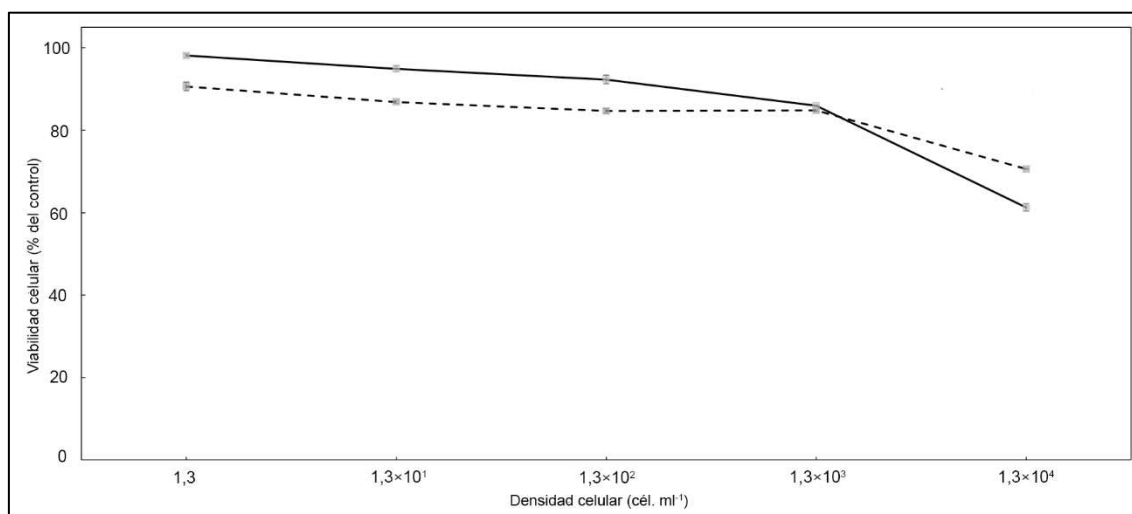


Fig. 5.5. Citotoxicidad de células lisadas (línea sólida) y sobrenadante (línea punteada) de la cepa LPCc051 contra las líneas celulares RTgill-W1. Los valores representan los promedios y las barras el error estándar de las cuatro réplicas.

Los valores de la concentración letal media (LC50) para la cepa LPCc049 fueron $1,6 \times 10^4$ cél. ml⁻¹ para el tratamiento sobrenadante y $1,9 \times 10^6$ cél. ml⁻¹ para el tratamiento intracelular, mientras que para la cepa LPCc051 los valores de LC50 fueron $1,3 \times 10^5$ cél. ml⁻¹ y $4,7 \times 10^5$ cél. ml⁻¹ (sobrenadante e intracelular, respectivamente).

5.4 – Discusión

Este trabajo presenta la primera caracterización de cepas argentinas de *Fibrocapsa japonica* provenientes de la bahía Samborombón y de aguas marinas costeras de la Provincia de Buenos Aires, en base a su morfología, filogenia, composición pigmentaria, fisiología y citotoxicidad.

Las cepas determinadas en este estudio con microscopía óptica y electrónica de transmisión mostraron semejanzas morfológicas significativas con el material tipo descrito originalmente por Toriumi & Takano (1973), analizado y enmendado posteriormente por Hara & Chihara (1985), así como con las cepas analizadas por Band-Schmidt *et al.* (2012) y Branco *et al.* (2019). Al igual que lo observado por Hara & Chihara, las cepas argentinas presentan cloroplastos discoidales con un único pirenoide, diferenciándose así de las observaciones iniciales de Toriumi & Takano. Además, las

cepas analizadas en este trabajo mostraron un rango mayor de largo celular en comparación con la cepa mexicana analizada por Band-Schmidt *et al.* (2012) y con la brasileña estudiada por Branco *et al.* (2018), lo que podría sugerir adaptaciones locales o variaciones intraespecíficas. Los cambios morfológicos observados en las distintas etapas de cultivo son consistentes con los estudios de Hara & Chihara (1985), de Boer *et al.* (2004) y Branco *et al.* (2019), quienes observaron que las células se redondean y agrandan ligeramente hasta quedar esféricas al final de la fase exponencial de crecimiento del cultivo y se agregan en la fase estacionaria.

Los análisis filogenéticos realizados agruparon a la mayoría de las secuencias argentinas junto con las japonesas, australianas, alemanas, una brasileña y dos estadounidenses, con la excepción de la secuencia correspondiente a la cepa LPCc050, que se posicionó como grupo hermano de todas las *F. japonica* incluidas en el análisis (Fig. 5.3). Las secuencias italianas provenientes de cepas aisladas del Mar Adriático se agruparon formando un subclado, como ha sido reportado anteriormente en la literatura utilizando distintas regiones de ADN (Klöpffer *et al.*, 2008, 2013; Cuchiari *et al.*, 2008; Branco *et al.*, 2019). Sin embargo, la inclusión de secuencias estadounidenses previamente no analizadas en estudios filogenéticos reveló una asociación con el subclado italiano (Fig. 5.3). Esto podría sugerir que las cepas italianas no representan un endemismo como fue propuesto por Klöpffer *et al.* (2008). Los resultados de este análisis refuerzan la hipótesis de una población cosmopolita con un alto grado de polimorfismo genético, como propuso Kooistra *et al.* (2001). Debido a que Kooistra *et al.* (2001) utilizaron la región ITS, y en este estudio se utilizó la D1-D2 del LSU, para estudiar la variabilidad genética y la relación filogeográfica de las cepas de *F. japonica* provenientes de distintas zonas geográficas, se deberían realizar análisis adicionales utilizando diferentes regiones del ADN y la mayor cantidad de secuencias disponibles.

La composición pigmentaria de las cepas argentinas de *F. japonica* mostró similitudes con los resultados hallados por Mostaert *et al.* (1998) para cepas japonesas, Band-Schmidt *et al.* (2004, 2012) para cepas mexicanas, Guidi-Rontani *et al.* (2010) para cepas japonesas, francesas, australianas y chinas, en los cuales la clorofila-*a* y la fucoxantina fueron los pigmentos mayoritarios. Adicionalmente, en menores y variables proporciones se encontraron pigmentos accesorios como clorofila-*c1* o *c1* + *c2* y otros carotenoides como β -carotenos, violaxantina y zeaxantina. A pesar de las similitudes,

ninguna de las cepas comparadas contuvo el complemento completo de todos los pigmentos reportados para esta especie. Las cepas analizadas por Mostaert *et al.* (1998) presentaron auroxantina y fucoxantínol, este último siendo exclusivo de *F. japonica* dentro de las rafidofíceas analizadas por dichos autores. Band-Schmidt *et al.* (2004, 2012) detectaron diadinoxatina, mientras que Guidi-Rontani *et al.* (2010) y el presente trabajo, anteraxantina. Como se discutió en el Capítulo 4 de esta tesis, los perfiles pigmentarios son una herramienta útil pero compleja para la identificación, y deben complementarse con análisis moleculares. La variabilidad en la composición y concentración de los pigmentos pueden deberse a diferentes condiciones de cultivo, al estado fisiológico de las cepas al momento del análisis (Mostaert *et al.*, 1998; Band-Schmidt *et al.*, 2012) y a las distintas técnicas y estándares utilizados. Para el caso de *F. japonica*, el fucoxantínol y los derivados de la fucoxantina pueden ser relevantes para una determinación precisa de la especie (Mostaert *et al.*, 1998). La ausencia de estos carotenoides en las cepas analizadas por Band-Schmidt *et al.* (2004, 2012) y por Guidi-Rontani *et al.* (2010) podría deberse a que no fueron considerados en sus análisis, por lo que deberían recibir especial atención en futuros estudios en este grupo.

Los resultados de las tasas de crecimiento (μ) de cepas argentinas de *F. japonica* bajo distintas condiciones de temperatura y salinidad obtenidos concuerdan con los de Boer *et al.* (2004). En este estudio, los valores máximos de μ para ambas cepas se alcanzaron a una salinidad de 25 (Tabla 5.3), comparable con el óptimo de crecimiento determinado por de Boer *et al.* (2004) en quince cepas aisladas de distintas regiones geográficas hallado a una salinidad de 26 ($\mu = 0,43 \text{ d}^{-1}$). En cuanto a la influencia de la temperatura, al comparar los resultados de este estudio (15 y 18 °C) con los obtenidos por de Boer *et al.* (2005, 15 y 20 °C, μ máxima $\sim 0,35 \text{ d}^{-1}$) y Cucchiari *et al.* (2008, 16 °C, μ máxima $\sim 0,15 \text{ d}^{-1}$), fue la cepa LPCc049 la que alcanzó una μ notablemente mayor. Estos resultados sugieren que la temperatura afecta de manera diferencial a las cepas, concordantemente con los hallazgos de de Boer *et al.* (2005), quienes también encontraron un efecto significativo de esta variable. *Fibrocapsa japonica* es una especie euriterma (Cucchiari *et al.*, 2008) y las temperaturas elegidas en este ensayo representan valores cercanos a los frecuentemente registrados en la bahía Samborombón (ver secciones 3.3.1.1 y 3.3.2.1 del Capítulo 3). Aunque las condiciones experimentales que promueven altas tasas de crecimiento difieren de las condiciones

naturales, proporcionan una idea de qué tan adaptadas están las cepas a las condiciones locales (de Boer *et al.*, 2005) y de las condiciones que podrían favorecer una floración. Además, el origen geográfico de las cepas juega un papel importante en su capacidad de adaptación a distintas condiciones, por ejemplo, en el estudio de de Boer *et al.* (2005), la cepa proveniente de Nueva Zelanda mostró mayor tolerancia al frío en los experimentos de laboratorio. Al considerar solo las cepas argentinas que fueron colectadas en un mismo sitio, LPCc049 mostró los mayores valores de μ en todas las condiciones probadas, sugiriendo que se deben realizar más experimentos para hallar el óptimo de crecimiento de la cepa LPCc051.

Este es el primer trabajo en confirmar la citotoxicidad de cepas argentinas de *Fibrocapsa japonica*. El potencial citotóxico de las cepas, evaluado a partir de experimentos utilizando las líneas celulares RTgill–W1, mostró que existen variaciones intraespecíficas, como ha sido documentado para otras rafidofíceas como *Chattonella marina* (Dorantes-Aranda *et al.*, 2013; Capítulo 4 de esta tesis). Entre las cepas bajo estudio, LPCc049 resultó ser la más citotóxica, disminuyendo la viabilidad de las líneas celulares al 53% en el tratamiento sobrenadante y al 68% en el tratamiento intracelular. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Dorantes-Aranda *et al.* (2015), quienes encontraron que la cepa japonesa FJCS332 reducía la viabilidad hasta el ~50% en el tratamiento sobrenadante y al 46% en el tratamiento intracelular. En este estudio el tratamiento intracelular solo resultó ser el más citotóxico en la cepa LPC051, reduciendo la viabilidad al 61%. Estas diferencias podrían explicarse debido a que los autores mencionados utilizaron una concentración algal mayor ($1,6 \times 10^4$ cél. ml⁻¹). Sin embargo, como se menciona en el Capítulo 4 (sección 4.1), se esperaría que los compuestos citotóxicos sean liberados activamente al medio en respuesta a la depredación o competencia y, por lo tanto, que el tratamiento sobrenadante sea el más citotóxico. Se han propuesto diferentes hipótesis sobre los mecanismos que causan citotoxicidad en esta especie. Debido a las variaciones intraespecíficas observadas, es necesario realizar una caracterización de compuestos como las especies reactivas de oxígeno (ROS) y los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en las cepas argentinas a fin de complementar los resultados y observar si estos compuestos se relacionan con las diferencias en los potenciales citotóxicos observados.

Fibrocapsa japonica ha causado mortandades masivas de peces de importancia comercial en Japón asociadas a importantes pérdidas económicas (Toriumi & Takano, 1973; Okaichi, 1989). En Argentina, la especie ha sido citada en aguas costeras bonaerenses por Sunesen *et al.* (2021) y en Uruguay por Méndez *et al.* (2013), en ambos casos sobre la base de análisis morfológicos. A pesar de que *F. japonica* no ha sido asociada a mortandades de organismos en esta zona, su adaptabilidad a crecer en condiciones variables de temperatura y salinidad, su capacidad de generar quistes de resistencia (Yoshimatsu, 1987) y su potencial citotóxico, sugieren que debería ser considerada una especie objetivo para los programas de monitoreo en Argentina, particularmente para las regiones donde se encuentran bancos naturales de peces de importancia comercial.

Capítulo 6

Heterosigma akashiwo

6.1 – Introducción

El género *Heterosigma* (Hada) Hada ex Y.Hara & Chihara pertenece a la Clase Raphidophyceae y se caracteriza por presentar especies de pequeño tamaño. Sus células son ligeramente aplanadas dorsiventralmente, con formas que varían de esferoidales a ovaladas u oblongas en vista dorsal o ventral. Presentan dos flagelos desiguales y heterodinámicos que emergen de una depresión subapical ubicada en el lado ventral, numerosos cloroplastos discoidales periféricos de color amarillo-amarronados y mucocistos esféricos debajo de la superficie celular (Hara & Chihara, 1987; Engesmo *et al.*, 2016; Branco *et al.*, 2019).

La historia nomenclatural del género ha sido objeto de controversias. De acuerdo con Throndsen (1996), probablemente la especie tipo del género (*Heterosigma akashiwo*) haya sido descrita por primera vez por Hulburt (1965) bajo el nombre de *Olithodiscus carterae* Hulburt. Posteriormente, Hada (1967) describió una especie similar, *Entomosigma akashiwo* Hada, y más tarde, el mismo autor propuso el género *Heterosigma* para incluir la especie descrita en 1967, estableciendo la nueva combinación *H. akashiwo* (Hada) Hada (Hada, 1968), y una nueva especie, *H. inlandica*. Dado que el nombre *Heterosigma* no fue válidamente publicado por Hada (1968), Hara & Chihara (1987) lo validaron proveyendo su diagnosis, designando a *H. akashiwo* como material tipo del género, asignando el holotipo e incluyendo a *H. inlandica* como sinónimo heterotípico. Posteriormente, debido a que el nombre de Hulburt (1965) presentaba prioridad sobre el nombre de Hada (1968), Taylor (1992) estableció una nueva combinación, *H. carterae* (Hulburt) Taylor (basónimo de *Olithodiscus carterae* Hulburt), a la que consideró sinónimo heterotípico de *H. akashiwo* (Hada) Hara & Chihara. Sin embargo, la propuesta de Taylor no prosperó debido a que Hulburt (1965) no había designado holotipo y, por lo tanto, el nombre no reunía los requisitos establecidos en los códigos de nomenclatura. Décadas más tarde, una nueva especie fue asignada al género, *H. minor* Tomas, Engesmo & Eikrem (Engesmo *et al.*, 2016).

Como ocurre con otras rafidofíceas, la identificación del género *Heterosigma* resulta difícil debido a que sus células frágiles se destruyen o deforman al utilizar fijadores convencionales (Thronsen, 1997; Branco *et al.*, 2019). El análisis de material vivo es requisito para la correcta identificación de especies dentro de este grupo (Thronsen, 1997), sin embargo, debido a que *H. akashiwo* es una especie pleomórfica, se requiere experiencia para determinarla mediante microscopía (Connell, 2000; Branco *et al.*, 2014). En este contexto, los análisis genéticos son una herramienta útil para realizar la determinación fehaciente de la especie. Connell (2000) llevó a cabo estudios moleculares utilizando la región del espaciador transcrito interno (ITS) de 19 cepas de *H. akashiwo* provenientes de Europa, Japón, Norte América y Nueva Zelanda, encontrando que 18 de las secuencias obtenidas eran idénticas, y postuló que la única cepa que presentaba diferencias podría corresponder a una subespecie. Posteriormente, Ki & Han (2007a) analizaron la región ITS, la subunidad pequeña (SSU) y la subunidad grande (LSU) de cepas provenientes de Japón, Korea y Norte América, y encontraron que todas presentaban un genotipo idéntico. Resultados similares fueron hallados por Branco *et al.* (2019) y Flores-Leñero *et al.* (2022) utilizando la región LSU del ADNr, con cepas de la costa de Brasil y los fiordos del sur de Chile respectivamente.

H. akashiwo es una especie considerada euriterma y eurihalina (Smayda, 1998; Martínez *et al.*, 2010), y se han reportado diferencias en los rangos óptimos de crecimiento para cepas procedentes de distintas regiones geográficas (Smayda, 1998). Estas diferencias han sido relacionadas con la producción de carotenoides, entre otros factores (Martínez *et al.*, 2010). Asimismo, la capacidad de realizar migración diurna le permite adaptarse a cambios fisicoquímicos del entorno y buscar condiciones favorables para su crecimiento (Watanabe *et al.*, 1988; Smayda, 1988), y la capacidad de generar quistes de resistencia le permite sobrevivir cuando las circunstancias son adversas (Itakura *et al.*, 1996; Imai *et al.*, 1999).

Debido a que *H. akashiwo* puede crecer en un amplio rango de condiciones fisicoquímicas (temperatura, salinidad, nutrientes y disponibilidad de luz), se encuentra ampliamente distribuida, habiendo sido registrada en todo el mundo excepto en aguas antárticas (Engesmo *et al.*, 2016). En Sudamérica ha sido reportada en Argentina, Brasil, Chile, Perú y Uruguay (Engesmo *et al.*, 2016; Sunesen *et al.*, 2021 y referencias allí).

Heterosigma akashiwo representa un organismo de interés en programas de monitoreo de fitoplancton nocivo debido a su capacidad ictiotóxica. Se han registrado floraciones algales nocivas (FAN) producidas por esta especie que han causado mortandades masivas de peces en cautiverio y pérdidas económicas millonarias en países como Canadá, Chile, Japón y Nueva Zelanda (Hallegraeff & Hara, 2004; Kempton *et al.*, 2008; Mardones *et al.*, 2023). En 2021, un intenso *bloom* de esta especie en la región de Los Lagos, Chile, produjo una pérdida mayor a las 5000 toneladas en la industria salmonera (Mardones *et al.*, 2023).

Los mecanismos responsables de la toxicidad en la Clase Raphidophyceae no están completamente comprendidos (ver Capítulos 4 y 5 de la presente tesis). Entre las hipótesis propuestas sobre el modo de acción de este grupo se incluyen: la producción excesiva de mucus que obstruye a las branquias causando asfixia (Chang *et al.*, 1990); la producción de compuestos neurotóxicos con efectos similares a las brevetoxinas (Khan *et al.*, 1997; Astuya *et al.*, 2015); la producción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés) (Marshall *et al.*, 2003) y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) asociada a daño en el tejido branquial que lleva a la producción de mucus, conduciendo a la hipoxia y a la asfixia (Oda *et al.*, 1997; Marshall *et al.*, 2005). Sin embargo, Marshall *et al.* (2003) demostraron que las ROS por sí solas no causan mortandad. En cambio, sí la causan la sinergia entre PUFAs y ROS, donde ciertos PUFAs en presencia de ROS aceleran la tasa de mortalidad (Marshall *et al.*, 2003; Dorantes-Aranda *et al.*, 2015). Estudios recientes para determinar la citotoxicidad de *H. akashiwo* en líneas celulares RTgill-W1 de branquias de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), utilizando como tratamientos células intactas (sobrenadante) y lisadas (intracelular), evidenciaron que en distintas cepas cada tratamiento tuvo un efecto diferente, siendo en algunos casos más tóxico el intracelular (Flores-Leñero *et al.*, 2022) y en otros el sobrenadante (Dorantes-Aranda *et al.*, 2015; Mardones *et al.*, 2023).

Aunque el género *Heterosigma* incluye especies que han ocasionado importantes pérdidas económicas a nivel global, su estudio en Argentina ha sido limitado. En virtud de estudiar las especies ictiotóxicas presentes en la bahía Samborombón, el objetivo de este capítulo es proporcionar la primera caracterización de cepas de *Heterosigma* aisladas del estuario y de aguas marinas costeras de la

Provincia de Buenos Aires a partir de su morfología, filogenia, perfil pigmentario, tasa de crecimiento y citotoxicidad.

6.2 – Metodología

Cinco cepas pertenecientes al género *Heterosigma* (LPCc053, LPCc054, LPCc055, LPCc056 y LPCc052) fueron aisladas de las muestras LPC13715 y LPC13734, colectadas en Tapera de López. La metodología de toma de muestras y aislamientos se encuentra descrita en la sección 2.1.2 y 2.2.1 del Capítulo 2 (Materiales y Métodos). A fines de complementar la información de este trabajo, fueron incluidas en los análisis tres cepas del mismo género (LPCc031, LPCc042 y LPCc057) aisladas de tres muestras (LPC 11515, LPC 11535, LPC 13795) provenientes de Villa Gesell (LPCc031 y LPCc042) y San Clemente (LPCc057). El detalle de las fechas y sitios de colecta, variables ambientales y código de acceso al GenBank se encuentran resumidos en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Datos generales sobre las ocho cepas de *Heterosigma* aisladas.

Cepa	Sitio de muestreo y código de herbario	Temperatura y salinidad del agua	Fecha	Aislador	Número de acceso GenBank
LPCc053	Tapera de López	21,5 °C	15/03/2020	Aguiar	OR494633
	LPC 13715	18,9		Juárez, D.	
LPCc054	Tapera de López	21,5 °C	15/03/2020	Aguiar	OR494980
	LPC 13715	18,9		Juárez, D.	
LPCc055	Tapera de López	21,5 °C	15/03/2020	Aguiar	OR494981
	LPC 13715	18,9		Juárez, D.	
LPCc056	Tapera de López	21,5 °C	15/03/2020	Aguiar	OR495593
	LPC 13715	18,9		Juárez, D.	
LPCc052	Tapera de López	23,0 °C	18/04/2021	Aguiar	OR494634
	LPC 13734	20,8		Juárez, D.	
LPCc031	Villa Gesell	19,4 °C	05/12/2017	Sunesen, I.	OR514479
	LPC 11515	32,8			
LPCc042	Villa Gesell	18,7 °C	13/04/2018	Sunesen, I.	PP799058
	LPC 11535	31,1			
LPCc057	San Clemente	22,0 °C	18/04/2021	Sunesen, I.	OR514480
	LPC 13795	23,1			

El análisis morfológico fue realizado según lo descrito en las secciones 2.2.2.3 para microscopía óptica (MO) y el análisis cuantitativo de presencia y abundancia de especies de este género fue realizado de acuerdo con lo detallado en la sección 2.2.3 del Capítulo 2 (Materiales y Métodos).

Los análisis filogenéticos fueron realizados según lo detallado en la sección 2.3 del Capítulo 2 utilizando 680 pb y datos de secuencias disponibles en GenBank (Anexo 6, Capítulo 9). Para enraizar el árbol de máxima verosimilitud se utilizó una secuencia de la diatomea *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & J.C. Lewis. Los análisis de pigmentos fueron realizados según lo descrito en la sección 2.4 del Capítulo 2 y las tasas de crecimiento como se indica en la sección 2.5.1 del mismo capítulo.

Los experimentos de citotoxicidad fueron realizados de acuerdo con lo descrito en la sección 2.5.2 del Capítulo 2. Para los mismos se usaron las cepas LPCc055, LPCc057 y LPCc031 en cinco concentraciones ($7,1 \times 10^4$; $7,1 \times 10^3$; $7,1 \times 10^2$; $7,1 \times 10^1$; $7,1 \text{ cél. ml}^{-1}$ para LPCc055; $1,5 \times 10^5$; $1,5 \times 10^4$; $1,5 \times 10^3$; $1,5 \times 10^2$; $1,5 \times 10^1 \text{ cél. ml}^{-1}$ para LPCc057 y $5,9 \times 10^4$; $5,9 \times 10^3$; $5,9 \times 10^2$; $5,9 \times 10^1$ y $5,9 \text{ cél. ml}^{-1}$ para LPCc031).

La determinación del efecto de la temperatura y la salinidad en la tasa de crecimiento (μ) de las cepas LPCc055 y LPCc031, y la evaluación del poder citotóxico de las tres cepas se realizó a través de un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías. La normalidad y homocedasticidad de varianza se comprobaron mediante la prueba de Shapiro-Wilk y de Levene, respectivamente. Posteriormente, se realizó una prueba de Tukey para identificar las diferencias entre tratamientos. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el software Jamovi. El cálculo de la concentración media letal (LC50) de las tres cepas se realizó mediante un modelo log-logístico a través del paquete *drc* (Ritz *et al.*, 2015) luego de elegir el mejor modelo usando la función *mselect* del mismo paquete, en el software R utilizando la interfaz RStudio (R Core Team, 2022).

6.3 – Resultados

6.3.1 Análisis morfológico de *Heterosigma akashiwo*

Las células son de color pardo-amarillento, ovaladas a elípticas o redondeadas (Fig. 6.1B,D) en vista ventral y dorsal, ligeramente aplanadas dorsiventralmente, comúnmente con el lado dorsal más convexo y el ventral más plano en vista lateral (Fig.

6.1A,C,E,F,H,I). El largo celular es de 13,4 a 36,3 μm (promedio 23,4 \pm 0,6), el ancho de 7,6 a 26,0 μm (promedio 15,9 \pm 0,4) y la relación largo ancho de 1,0 a 2,5 (promedio de 1,5 \pm 0,0) (n = 93). En algunas ocasiones, las células desarrollan una pequeña cola, independientemente de la etapa de crecimiento en que se encuentra el cultivo (Fig. 6.1C, G, flechas negras).

Las células son biflageladas, con un flagelo dirigido anteriormente activo durante la natación (Fig. 6.1D) y el otro dirigido hacia atrás (no mostrado), ambos emergiendo de una depresión oblicua en la región anterior ventral de la célula (Fig. 6.1A,C,E,F). El núcleo es grande, ovalado y está situado en el centro de la célula (Fig. 6.1A-I).

Los cloroplastos son numerosos, generalmente más de 20, discoidales y ubicados en la periferia celular (Fig. 6.1A,D,G-I). En la superficie celular se encuentran numerosos mucocistos circulares (Fig. 6.1F,H, flechas negras). En la región media-posterior de la célula pueden observarse partículas refringentes redondeadas (Fig. 6.1C,H).

En algunas células, independientemente de la fase de crecimiento, se pudo observar una invaginación tubular en el extremo posterior de la célula (Fig. 6.1E,I, flechas negras). A finales de la fase de crecimiento exponencial y comienzos de la estacionaria, las células se agregan en cadenas de mucus (no mostrado).

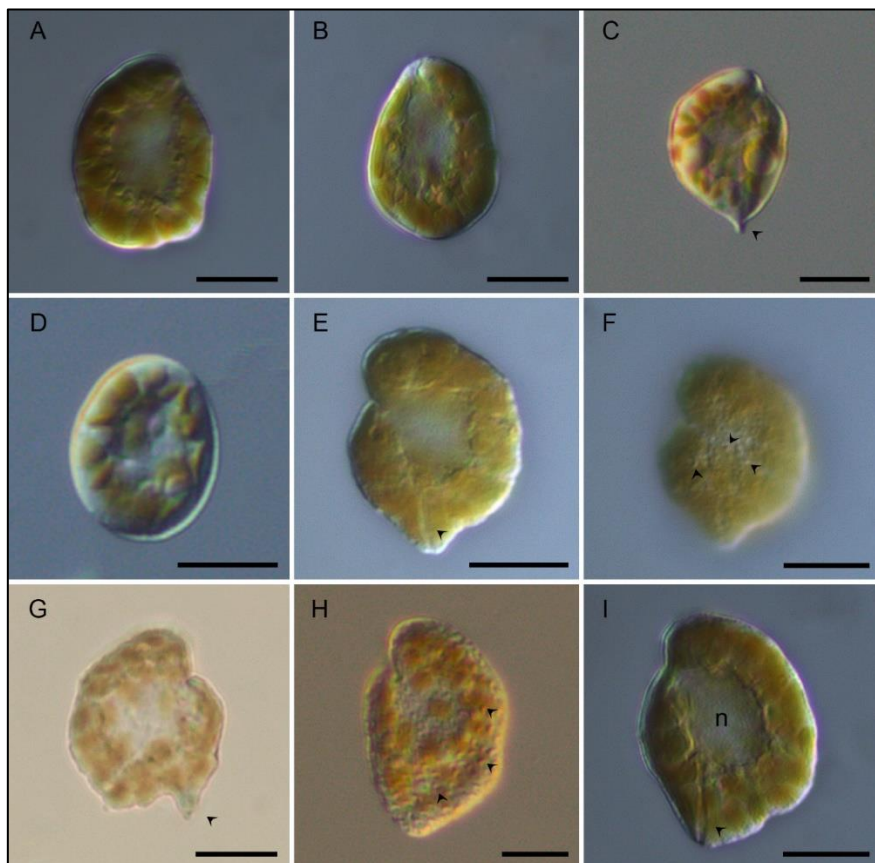


Fig. 6.1. Células de *Heterosigma akashiwo* bajo MO. **A-C** cepa LPCc055 durante fase de crecimiento exponencial. Célula con pequeña cola (C, flecha). **D**, cepa LPCc052 durante fase de crecimiento exponencial. **E-F**, cepa LPCc056 durante fase de crecimiento exponencial. Nótese invaginación tubular en el extremo posterior de la célula (E, flecha). Nótese los mucocistos esparcidos en la superficie celular (F, flechas). **G-H** cepa LPCc056 durante fase de crecimiento estacionario. Célula con pequeña cola (G, flecha) y mucocistos en la superficie celular (H, flechas). **I**, cepa LPCc053 durante fase de crecimiento exponencial mostrando región del núcleo (n). Note invaginación tubular en el extremo posterior de la célula (flecha). Escala = 10 μm .

6.3.2 Ocurrencia de *Heterosigma akashiwo* en la bahía Samborombón

Heterosigma akashiwo estuvo presente en el 2% de las muestras obtenidas desde la costa y no fue registrada en las muestras colectadas desde embarcación, posiblemente debido a la fragilidad de las células al ser fijadas. Las muestras donde la especie ha sido registrada fueron colectadas en verano y otoño, y la abundancia celular osciló entre $0,06 \times 10^4$ y $33,0 \times 10^4$ cél. l⁻¹.

La temperatura promedio del agua al momento de la colecta de las muestras en que *H. akashiwo* fue hallada fue de 22,3 °C, con un mínimo de 21,5 °C y un máximo de 22,9 °C, y la salinidad promedio fue de 19,9, con un mínimo de 18,9 y un máximo de 20,8.

6.3.3 Filogenia

El análisis de máxima verosimilitud (MV) y el de inferencia bayesiana (IB) mostraron resultados similares, agrupando a las secuencias correspondientes a las ocho cepas argentinas en el clado de *H. akashiwo* con un 99% de Bootstrap y 1 de probabilidad posterior bayesiana (Fig. 6.2).

Entre las secuencias de *H. akashiwo* la distancia genética media neta (distancia- p) fue de 0,0007 y entre las secuencias de las cepas argentinas la distancia- p fue de 0,0006.

en este capítulo. El soporte de las ramas se muestra como MV/Inferencia bayesiana (IB). Sólo se muestran los valores >60% (MV) o >0,6 (IB).

6.3.4 Análisis de pigmentos

Los análisis por HPLC realizados a las cepas LPCc056 y LPCc057 mostraron que la clorofila-*a* fue el pigmento predominante con clorofila-*c2* como pigmento accesorio (Tabla 6.2). En ambas, la fucoxantina (Fuc) fue el carotenoide más abundante, seguida de violaxantina (Viol), anteraxantina (Ant), zeaxantina (Zea) y β -caroteno (β) en la cepa LPCc056 (Tabla 6.2). En la cepa LPCc057, Ant y Zea no fueron registrados (Tabla 6.2).

Si bien ambas cepas fueron cultivadas bajo las mismas condiciones, exhibieron patrones diferentes en cuanto a la composición y concentración pigmentaria. La cepa LPCc056 presentó concentraciones mayores de pigmentos en general, y una mayor variedad de carotenoides en comparación con LPCc057.

Tabla 6.2. Composición pigmentaria de las cepas LPCc056 y LPCc057. Los resultados se expresan en $\text{pg c\acute{e}l.}^{-1}$. Referencias, Chl-*a*, clorofila-*a*; Chl-*c2*, clorofila-*c2*; Fuc, fucoxantina; Viol, violaxantina; Ant, anteraxantina; β , β -caroteno; Zea, zeaxantina.

Cepa	Chl- <i>a</i>	Chl- <i>c2</i>	Fuc	Viol	Ant	β	Zea
LPCc056	296,3	31,5	118,2	9,8	9,5	7,4	8,9
LPCc057	123,9	9,1	32,5	3,0	–	2,9	–

6.3.5 Tasas de crecimiento

Las densidades máximas halladas entre las cepas LPCc055 y LPCc031 bajo las distintas condiciones de temperatura y salinidad establecidas en este estudio fueron diferentes. La cepa LPCc055 alcanzó una densidad de $8,1 \times 10^4$ $\text{c\acute{e}l. ml}^{-1}$ a 18 °C y 20 de salinidad, mientras que la cepa LPCc031 alcanzó $0,5 \times 10^4$ $\text{c\acute{e}l. ml}^{-1}$ a 18 °C y 30 de salinidad. Ninguno de los tratamientos resultó significativo en las cepas testeadas para la tasa de crecimiento (ANOVA, $p=0,95$ para LPCc055 y $p=0,80$ para LPCc031) y los valores de μ fueron similares para cada una. En la cepa LPCc055, μ osciló entre $0,02 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$ y $0,91 \pm 0,2 \text{ d}^{-1}$, mientras que en LPCc031, lo hizo entre $0,03 \pm 0,02 \text{ d}^{-1}$ y $0,28 \pm 0,1 \text{ d}^{-1}$. En ambos casos, la μ máxima se halló a 18 °C y 30 de salinidad (Tabla 6.3).

Tabla 6.3. Valores máximos de tasa de crecimiento (μ en d^{-1}) alcanzados por las cepas LPCc055 y LPCc031 en cada tratamiento. Referencias, T: temperatura, S: salinidad.

Cepa	T 15 °C			T 18 °C		
	S 20	S 25	S 30	S 20	S 25	S 30
LPCc055	0,76	0,64	0,69	0,77	0,59	0,91
LPCc031	0,20	0,20	0,25	0,20	0,25	0,28

6.3.6 Experimentos con líneas celulares

La viabilidad de las líneas celulares RTgill–W1 después de 2 h de exposición a las cepas LPCc055, LPCc057 y LPCc031 fue diferente según la cepa. Las cepas LPCc055 y LPCc057 resultaron citotóxicas, mostrando diferencias significativas en la viabilidad de las líneas entre tratamientos (intracelular y sobrenadante) y entre las diferentes concentraciones celulares (ANOVA, $p < 0,01$). La cepa LPCc055 redujo la viabilidad al 48% a la máxima concentración (Fig. 6.3), mientras que la cepa LPC057 bajo las mismas condiciones, la redujo al 39% (Fig. 6.4). En contraste, el tratamiento intracelular no mostró toxicidad para la cepa LPCc055 (85%) y una tendencia a reducir la viabilidad en la cepa LPCc057, reduciéndola al 69% a la máxima concentración (Fig. 6.4). La cepa LPCc031 no presentó diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA, $p = 0,97$) pero si en la concentración algal utilizada, siendo la concentración más alta significativamente diferente del resto ($p < 0,01$, test de Tukey). Esta cepa no resultó tóxica y la viabilidad celular fue de 92% en el tratamiento intracelular y de 85% en el sobrenadante (Fig. 6.5).

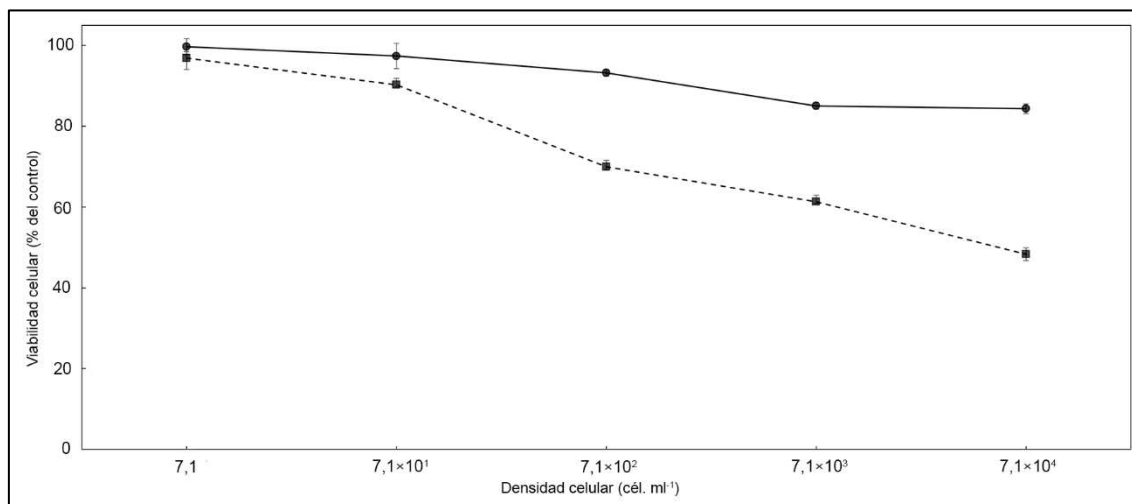


Fig. 6.3. Citotoxicidad de células lisadas (línea sólida) y sobrenadante (línea punteada) de la cepa LPCc055 contra las líneas celulares RTgill–W1. Los valores representan los promedios y las barras el error estándar de las cuatro réplicas.

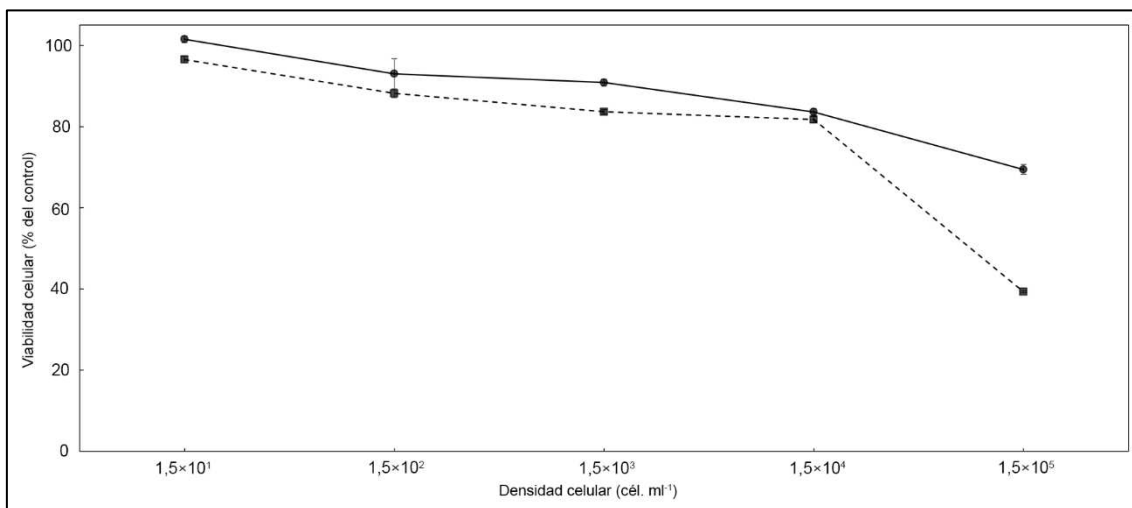


Fig. 6.4. Citotoxicidad de células lisadas (línea sólida) y sobrenadante (línea punteada) de la cepa LPCc057 contra las líneas celulares RTgill–W1. Los valores representan los promedios y las barras el error estándar de las cuatro réplicas.

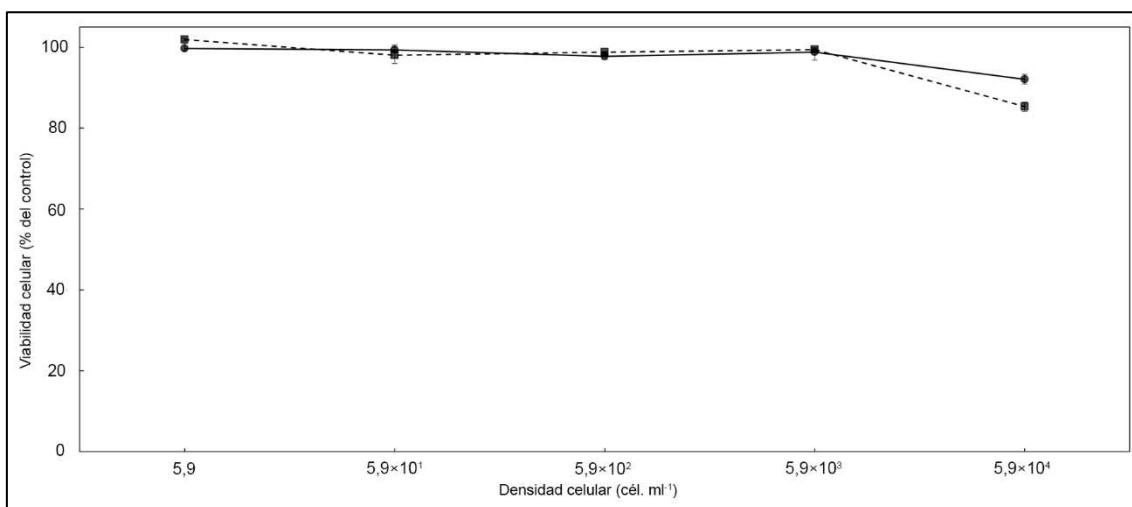


Fig. 6.5. Citotoxicidad de células lisadas (línea sólida) y sobrenadante (línea punteada) de la cepa LPCc031 contra las líneas celulares RTgill–W1. Los valores representan los promedios y las barras el error estándar de las cuatro réplicas.

La concentración letal media (LC50) de las tres cepas analizadas en cada tratamiento se detalla en la Tabla 6.4.

Tabla 6.4. Concentración letal media (LC50) en cél. ml⁻¹ de las cepas LPCc055, LPCc057 y LPCc031 de *H. akashiwo* obtenidos a partir de los ensayos con RTgill–W1 en ambos tratamientos (intracelular y sobrenadante).

Tratamiento	LPCc055	LPCc057	LPCc031
Intracelular	72,0 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁸	1,6 x 10 ⁸
Sobrenadante	4,3 x 10 ⁴	9,6 x 10 ⁴	3,8 x 10 ⁸

6.4 – Discusión

Este trabajo presenta la primera caracterización morfológica, molecular, pigmentaria, fisiológica y citotóxica de cepas argentinas de *Heterosigma akashiwo* provenientes de la bahía Samborombón y de aguas marinas costeras de la Provincia de Buenos Aires.

Los materiales de *H. akashiwo* analizados en el presente estudio mediante microscopía óptica mostraron semejanzas morfológicas con los descriptos por Hara & Chihara (1987), Chang *et al.* (1990), Engesmo *et al.* (2016) y Branco *et al.* (2019), con diferencias en la longitud máxima y promedio de las células, que fueron mayores en las cepas argentinas. Los rangos de tamaño de las cepas en este análisis son notablemente superiores a los descriptos por Engesmo *et al.* (2016) en el protologo de *H. minor*. Consistentemente con lo observado por Hara & Chihara (1987) y, a diferencia de lo reportado por Branco *et al.* (2019), se advirtieron cambios en la morfología celular en distintas etapas del cultivo, donde algunas células se redondearon y agregaron en mucus a finales de la fase exponencial y comienzos de la estacionaria, y otras aumentaron su tamaño durante la fase estacionaria. El número de cloroplastos por célula coincidió con los reportados por Hara & Chihara (1987), Engesmo *et al.* (2016) y Branco *et al.* (2019), y siempre fue mayor al reportado *H. minor* (Engesmo *et al.*, 2016). Según la literatura disponible sobre el género *Heterosigma*, hasta el presente no se había mencionado el desarrollo de una pequeña cola en especímenes en cultivo, independiente de la fase de crecimiento en que se encuentre. Otro carácter distintivo de las cepas de *H. akashiwo* analizadas en este capítulo respecto a la literatura disponible fue la observación de una invaginación tubular en el extremo posterior de la célula (Fig. 6.1E,I), una característica distintiva del género *Haramonas* (Clase Raphidophyceae). Sin embargo, las cepas de este estudio no presentaban esta invaginación consistentemente, y los rangos de tamaño fueron menores tanto en longitud como en ancho celular respecto a las especies

Haramonas dimorfa Horiguchi (Horiguchi, 1996), *H. viridis* Horiguchi et Hoppenrath (Horiguchi & Hoppenrath, 2003) y *H. pauciplastida* Yamaguchi, Hoppenrath, Takishita et Horiguchi (Yamaguchi *et al.*, 2008). A su vez, el género *Haramonas* se caracteriza por presentar los cloroplastos ligeramente superpuestos, rasgo que no se observó en las cepas de este trabajo.

Esta es la primera identificación genética de cepas de *H. akashiwo* provenientes de Argentina. Al igual que los estudios de Branco *et al.* (2019) y Flores-Leñero *et al.* (2022), los resultados mostraron una variabilidad genética muy baja respecto de cepas provenientes de distintas partes del mundo. Resultados similares fueron obtenidos usando otras regiones de ADN por Connell (2000) y Ki & Han (2007a), quienes también encontraron una variabilidad sorprendentemente baja para una especie tan ampliamente distribuida. En su trabajo, Ki & Han (2007a) concluyeron que las poblaciones de *H. akashiwo* son idénticas, y sugirieron que se deben haber dispersado recientemente desde un punto de origen.

La composición pigmentaria de las cepas LPCc056 y LPCc057 coincidió con aquellas reportadas por Mostaert *et al.* (1998) y Flores-Leñero *et al.* (2022) para *H. akashiwo* en cuanto a que la clorofila-*a* fue el pigmento dominante, seguido por el carotenoide fucoxantina. Entre las cepas argentinas, LPCc056 presentó mayores concentraciones y un perfil más completo (Tabla 6.2), con anteraxatina y zeaxantina, en concordancia con las cepas japonesas estudiadas por Mostaert *et al.* (1998) y con la cepa chilena estudiada por Flores-Leñero *et al.* (2022). La ausencia de estos carotenoides en la cepa LPCc057 también ha sido observada por Martínez *et al.* (2010) en cepas provenientes de España, Nueva Zelanda y EE. UU. Por otro lado, ninguna de las cepas argentinas presentó clorofila-*c1* a diferencia de las investigadas por Mostaert *et al.* (1998), Martínez *et al.* (2010) y Flores-Leñero *et al.* (2022), ni peridininina, que fue detectada en la cepa chilena (Flores-Leñero *et al.*, 2022). Como se ha discutido en los Capítulos 4 y 5 de esta tesis, la composición pigmentaria puede variar debido a las condiciones de cultivo, al estado fisiológico de las cepas y a las técnicas utilizadas para realizar los análisis. Además, diversos estudios han demostrado que los perfiles pigmentarios pueden modificarse en respuesta a factores ambientales tales como la disponibilidad de nutrientes, la intensidad lumínica, la turbidez y la estructura vertical de la columna de agua, particularmente en especies como *H. akashiwo*, donde la

migración vertical y el comportamiento mixotrófico pueden influir en la acumulación de pigmentos fotoprotectores (Flores-Leñero *et al.*, 2022; Mardones *et al.*, 2023). Debido a que las cepas provenientes de diferentes, o incluso de las mismas regiones geográficas, presentan variaciones en el perfil pigmentario (Mostaert *et al.*, 1998; Flores-Leñero *et al.*, 2022; este estudio), el estudio de su composición debe tomarse con cautela al utilizarse para la determinación de géneros o especies dentro del grupo, y complementarse con análisis moleculares.

Las tasas de crecimiento de las cepas LPCc055 y LPCc031 resultaron diferentes entre sí posiblemente debido a variaciones intraespecíficas entre las cepas, consistentemente con lo reportado para la misma especie por Martínez *et al.* (2010). Los valores observados estuvieron dentro de los rangos reportados por Martínez *et al.* (2010, a 17 y 23 °C y 20 y 35 de salinidad), Strom *et al.* (2013, a 30 °C y 20, 25 y 30 de salinidad) y Flores-Leñero *et al.* (2022, a 12 y 17 °C y 25, 30 y 35 de salinidad). La cepa LPC055 alcanzó valores de μ máximos mayores a los observados por dichos autores, pero inferiores a los reportados por Ono *et al.* (2000, a 30 °C y 25 de salinidad). En ambas cepas argentinas se observó una ligera tendencia de mayores tasas de crecimiento a mayor temperatura y salinidad. Sin embargo, el efecto de estas variables no resultó significativo. Concordantemente, Flores-Leñero *et al.* (2022) determinaron que la respuesta de μ de la cepa chilena a diferentes condiciones de temperatura y salinidad no resultó significativo. Martínez *et al.* (2010) también observaron una tendencia de mayor crecimiento a mayor temperatura, y solo dos de las seis cepas analizadas mostraron diferencias significativas para esta variable. Cabe destacar que la cepa LPCc055, fue aislada de una muestra proveniente de la bahía Samborombón y fue la que presentó mayores valores de μ y una mayor adaptabilidad a las condiciones testeadas. En cambio, la cepa LPCc031, proveniente de Villa Gesell, exhibió menores valores máximos de μ (Tabla 6.3). Diferencias en la tasa de crecimiento de cepas provenientes de diferentes lugares con distintas salinidades ya han sido discutidas por Martínez *et al.* (2010), quienes sugieren que una población aclimatada por mucho tiempo a un rango de salinidad no se adapta rápidamente (en dos o tres generaciones previas a un experimento) a condiciones diferentes. Nuevos estudios probando salinidades mayores a 30 deberían realizarse en la cepa LPCc031 para corroborar si tiene mejor desempeño a mayor salinidad, lo que indicaría una baja adaptabilidad a valores menores, como los

que se encuentran en el estuario del Río de la Plata.

Este estudio es el primero en confirmar la citotoxicidad de cepas argentinas de *Heterosigma akashiwo* provenientes de la bahía Samborombón y aguas costeras de la Provincia de Buenos Aires. Los efectos citotóxicos observados en los experimentos con RTgill–W1 fueron variados. Mientras que la cepa LPCc031 no mostró citotoxicidad en ningún tratamiento, las cepas LPCc055 y LPCc057 redujeron la viabilidad de las líneas celulares en el tratamiento sobrenadante al 48% y 39%, respectivamente. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Dorantes-Aranda *et al.* (2015) y Mardones *et al.* (2023), quienes también encontraron una mayor citotoxicidad en el tratamiento sobrenadante, reduciendo la viabilidad al 65% y al 29%, respectivamente, a la máxima concentración (4×10^4 cél. ml⁻¹). No obstante, los patrones de citotoxicidad de *H. akashiwo* presentan algunas inconsistencias. Un estudio realizado por Flores-Leñero *et al.* (2022) mostró que únicamente el tratamiento intracelular fue citotóxico a una concentración de $4,7 \times 10^4$ cél. ml⁻¹, levemente superior a la utilizada por Dorantes-Aranda *et al.* (2015) y por Mardones *et al.* (2023), pero inferior a las máximas utilizadas en este estudio. En este trabajo, la máxima reducción de la viabilidad para el tratamiento intracelular fue observado con la cepa LPCc057 a una concentración de $1,5 \times 10^4$ cél. ml⁻¹. Flores-Leñero *et al.* (2022) concluyeron que la cepa chilena CREAN_HA03 es ligeramente tóxica sólo en altas concentraciones y los resultados de este capítulo aportan a esta idea. Por otro lado, Sandoval-Sanhueza *et al.* (2022) realizaron experimentos de citotoxicidad con la cepa CREAN_HA03 y la línea celular CHSE–214 (proveniente de embriones del salmón Chinook, *Onchrrhynchus tshwyttscha*), encontrando que a bajas densidades (2×10^1 cél. ml⁻¹) la viabilidad se redujo en un 100%. De manera contradictoria, en esos experimentos la viabilidad aumentó al incrementar la concentración microalgal. Estas discrepancias subrayan la importancia de utilizar un bioensayo estándar y, hasta el momento, el bioensayo utilizando RTgill–W1 ha demostrado ser el más adecuado (Flores-Leñero *et al.*, 2022). Independientemente del método utilizado, tanto Sandoval-Sanhueza *et al.* (2022) como Mardones *et al.* (2023) observaron que la citotoxicidad era mayor a mayor salinidad, un fenómeno reportado en otras especies como *Pseudochattonella verruculosa* (Mardones *et al.*, 2019). Estos resultados sugieren que la salinidad juega un papel importante en el comportamiento fisiológico de *H. akashiwo*, afectando su potencial citotóxico. Para comprender mejor

los mecanismos y los factores que influyen en la citotoxicidad de esta especie, se deben realizar más estudios con un bioensayo estándar que facilite las conclusiones.

La comparación de los valores de LC50 obtenidos en este trabajo con el valor calculado a partir del trabajo de Flores-Leñero *et al.* (2022) para la cepa CREAN_HA03 ($1,4 \times 10^5$ cél. ml⁻¹ para tratamiento intracelular y $4,2 \times 10^6$ cél. ml⁻¹ para tratamiento sobrenadante) permite establecer que la cepa LPCc055 es la que presentó un LC50 menor en ambos tratamientos y, por lo tanto, es más tóxica a menores concentraciones.

Dado que *Heterosigma akashiwo* ha causado numerosas mortandades masivas de peces en otras regiones de Sudamérica como Brasil (Branco *et al.*, 2014) y Chile (Mardones *et al.*, 2023), que ha sido previamente reportada para aguas costeras argentinas (Sunesen *et al.*, 2021) y uruguayas (Méndez *et al.*, 2013), que presenta capacidad de adaptarse para resistir condiciones adversas, y que en este estudio se demuestra su capacidad citotóxica con potencial ictiotóxico, debería ser considerada una especie objetivo para programas de monitoreo en Argentina, particularmente los desarrollados en regiones que presentan bancos naturales de peces de importante comercial.

Capítulo 7

Gymnodinium catenatum y *G. impudicum*

7.1 – Introducción

Gymnodinium Stein (Dinophyceae, Gymnodiniales) es un género de dinoflagelados atecados que contiene más de 200 especies (Larsen & Nguyen, 2004; Elbrächter & Hoppenrath, 2009), muchas de las cuales solo se registraron una única vez (Thessen *et al.*, 2012). Originalmente el género fue delimitado en base a caracteres morfológicos observados con microscopía óptica, e incluía a especies cuyo cingulum presentaba un desplazamiento menor al 20% de la longitud celular (Kofoid & Swezy, 1921). De las 234 especies identificables enlistadas por Thessen *et al.* (2012), en la actualidad menos de 20 conforman el género luego de que fuera enmendado por Hansen & Moestrup en Daugbjerg *et al.* (2000) en función de la presencia del surco apical o acrobases con forma de herradura, de la envoltura nuclear con cámaras vesiculares y del conectivo fibroso nuclear (Daugbjerg *et al.*, 2000; Gu *et al.*, 2013). Actualmente es un género parafilético (Gu *et al.*, 2013).

G. catenatum Graham es el único dinoflagelado atecado conocido por producir toxinas paralizantes de moluscos o poisoning shellfish toxins (PST) (Anderson *et al.*, 1989; Oshima *et al.*, 1993; Rees & Hallegraeff, 1991; Taylor *et al.*, 2004). Esta especie fue descrita a partir de una cepa procedente del Golfo de California (México) por Graham (1943) y en la escueta descripción original basada en material fijado con formol, fue caracterizada por presentar forma circular a cuadrada en vista ventral, redondeada anteriormente, con el cingulum sin desplazamiento y profundamente marcado, y el sulcus extendido desde el ápex al antápex. Posteriormente, Balech (1964b) analizó una cepa proveniente de Mar del Plata y la describió con forma elipsoidal en fases de crecimiento exponencial, y casi cuadrada en material fijado o en fases de crecimiento estacionario. Asimismo, observó que el cingulum presentaba un desplazamiento descendente. Una característica distintiva de *G. catenatum* es la formación de cadenas generalmente de 16 células y de un máximo de 64 (Fraga *et al.*, 1995; Lassus *et al.*, 2016).

Otra especie perteneciente al mismo género formadora de cadenas es *G. impudicum* Fraga & Bravo, descrita en Fraga *et al.* (1995) a partir de material colectado

en el puerto de Valencia, España, que originalmente había sido determinada por su similitud morfológica como *G. catenatum* pero presentaba células de menor tamaño y colonias más cortas. *Gymnodinium impudicum* también ha sido observado como productor de mareas rojas que no han causado daños en peces o moluscos y no ha sido asociado a la producción de toxinas (Fraga *et al.*, 1995).

A pesar de la similitud morfológica entre *G. catenatum* y *G. impudicum* (Fraga *et al.*, 1995), los árboles filogenéticos realizados a partir de subunidad grande del ADN mostraron que la última es más cercana a especies del género *Barrufeta* N.Sampedro & S.Fraga que a *G. catenatum* (Reñé *et al.*, 2011; Gu *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2018).

Gymnodinium catenatum se encuentra ampliamente distribuido y ha sido registrado en aguas templadas, subtropicales y tropicales alrededor del mundo (Hallegraeff *et al.*, 2012; Bustillos-Guzmán *et al.*, 2015; Lassus *et al.*, 2016), mientras que *G. impudicum* se distribuye principalmente en regiones templadas (Fraga *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 2018) y no ha sido registrado en aguas argentinas. *G. catenatum* fue citado en aguas costeras de la Provincia de Buenos Aires por Balech (1964) cuando aún se desconocía su potencialidad para producir toxinas. Su presencia en las Rías de Galicia, España, y en el Golfo de California, México, asociada a eventos de envenenamiento paralizante de moluscos (PSP, por sus siglas en inglés) fue el primer indicio de que esta especie podía producir PST (Estrada *et al.*, 1984; Mee *et al.*, 1986). El evento de México, con pérdida de vidas humanas y una extensa mortandad de peces, fue asociado con una intensa marea roja producida por esta especie y a la presencia de PSTs en el plancton detectada mediante bioensayo ratón (Mee *et al.*, 1986).

El perfil tóxico de *G. catenatum* fue determinado por primera vez a partir de material de cultivo proveniente de Tasmania, Australia (Oshima *et al.*, 1987). Actualmente, esta especie es conocida por producir saxitoxinas (STX), decarbamoil saxitoxina (dcSTX), N-sulfocarbamoil gonyautoxinas (GTX1-GTX4), y las menos tóxicas, N-sulfocarbamoil-11-hidroxisulfato B- y C- toxinas (B1, B2, C1-C4), desoxi-decarbamoil saxitoxina (doSTX), desoxi-decarbamoil gonyautoxinas 3 (doGTX3) y derivados del hidroxibenzoil (toxinas GC) (Liu *et al.*, 2020 y referencias ahí).

El primer episodio tóxico en el Océano Atlántico Sudoccidental asociado a *G. catenatum* fue reportado para las costas uruguayas (Méndez, 1993). En Argentina esta especie ha sido vinculada a floraciones algales nocivas (FAN) asociadas a la producción

de PSP (Akselman *et al.*, 1998; Montoya *et al.*, 2006; Sunesen *et al.*, 2014), y su perfil tóxico ha sido determinado a partir de muestras de campo de Mar del Plata durante un *bloom* en otoño temprano (Montoya *et al.*, 2006).

A pesar de la relevancia de *G. catenatum* como productor de FAN asociados a episodios de PSP que han llevado a intoxicación y muerte de personas junto con una masiva mortandad de peces (Mee *et al.*, 1986), no hay, hasta el presente, una descripción morfológica sustentada por análisis filogenéticos para cepas argentinas. El objetivo de este capítulo es brindar la primera caracterización de cepas del género *Gymnodinium* provenientes de la bahía Samborombón, basada en morfología, filogenia y toxinas.

7.2 – Metodología

Dos cepas pertenecientes al género *Gymnodinium* (LPCc043 y LPCc044) fueron aisladas de la muestra LPC13727, colectada en Tapera de López. La metodología de toma de muestras y aislamiento de cepas ha sido descrita en la sección 2.1.2 y 2.2.1 del Capítulo 2 (Materiales y Métodos). El detalle de la fecha y sitio de colecta, variables ambientales y código de acceso al GenBank se encuentran resumidos en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1. Datos generales sobre las dos cepas de *Gymnodinium* aisladas.

Cepa	Sitio de muestreo y código de herbario	Temperatura y salinidad del agua	Fecha	Aislador	Número de acceso GenBank
LPCc043	Tapera de López	23,6 °C	28/02/2021	Aguiar	OP850345
	LPC 13727	20,0		Juárez, D.	
LPCc044	Tapera de López	23,6 °C	28/02/2021	Aguiar	OP851763
	LPC 13727	20,0		Juárez, D.	

Los métodos implementados para la observación de ambas cepas con microscopía óptica (MO) y microscopía electrónica de barrido (MEB) fueron descritos en las secciones 2.2.3.1 y 2.2.3.2 del Capítulo 2. El análisis cuantitativo de presencia y abundancia de este género fue realizado según lo descrito en la sección 2.2.4 del Capítulo 2 (Materiales y Métodos).

Los análisis filogenéticos fueron hechos según lo detallado en la sección 2.3 del Capítulo 2 utilizando 678 pb y datos de secuencias disponibles en GenBank (Anexo 7, Capítulo 9). Para enraizar el árbol de máxima verosimilitud se utilizó una secuencia de *Noctiluca scintillans* (Macartney) Kofoid & Swezy.

Los análisis de toxinas fueron realizados según lo descrito en la sección 2.7 del Capítulo 2.

7.3 – Resultados

7.3.1 Análisis morfológico

Gymnodinium catenatum (cepa LPCc043)

Referencias: Graham 1943: 259, Figs. 1, 2; Rees & Hallegraeff 1991: 91, Figs. 1–25; Liu *et al.* 2020: 6, Fig. 2 A-I, fig. 3 A-H.

Las células son de color pardo-amarillento, con forma cónica. Tanto en células solitarias como en coloniales, el epicono está truncado y el hipocono aplanado (Fig. 7.1A-F), y este último excede al epicono. En las células solitarias, el largo celular es de 45,4 a 73,6 μm (promedio $56,8 \pm 1,3$) y el ancho de 33,3 a 53,2 μm (promedio $41,9 \pm 1,0$) ($n = 40$). En células coloniales, el largo celular es de 29,1 a 53,2 μm (promedio $41,7 \pm 1,6$) y el ancho de 30,4 a 44,5 μm (promedio $37,5 \pm 0,9$) ($n = 28$).

El cingulum es descendente, con un desplazamiento entre 1/5 a 1/6 de la longitud celular, aproximadamente un ancho cingular (Fig. 7.1A-C). El sulcus se extiende desde el cingulum hasta el antapex, y penetra recto en el epicono, cerca pero independiente del surco apical en forma de herradura (Fig. 7.1G,H).

Los cloroplastos de color amarillo-verdoso a amarillo-amarronados (Fig. 7.1A-E). El núcleo es ovoide a redondeado, grande, y se sitúa en el centro (Fig. 7.1C, E) o ligeramente desplazado del plano medio ventral (Fig. 7.1D).

El anfrisma presenta vesículas superficiales en forma de panal que cubren completamente a la célula y definen los márgenes de la acrobasis y del cingulum (Fig. 7.1G,H).

Las células se organizan en colonias alargadas, generalmente de cuatro células pudiendo llegar a 16 (Fig. 7.1F).

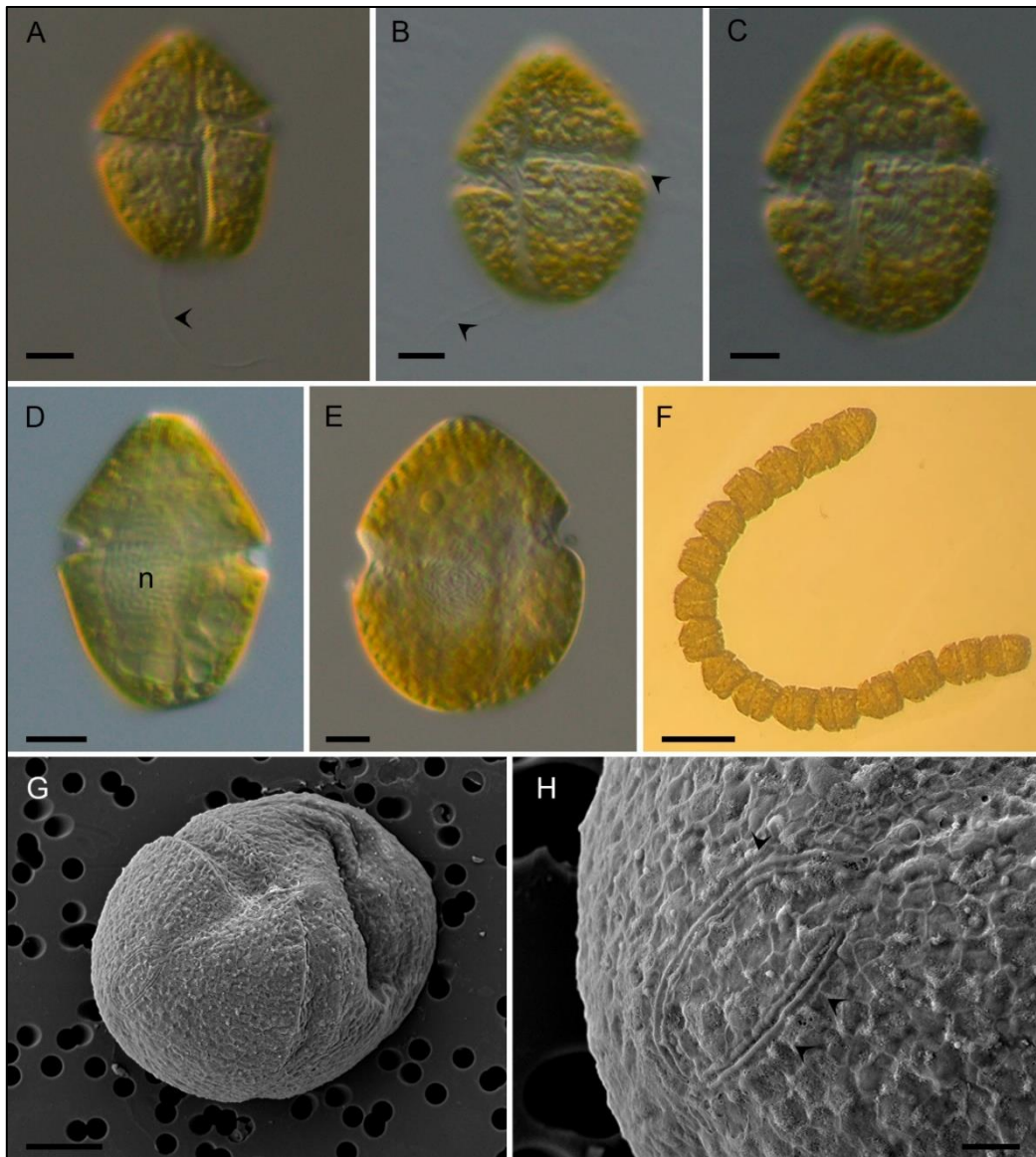


Fig. 7.1. *Gymnodinium catenatum* durante fase de crecimiento exponencial. **A-F**, MO. **A-C**, célula en vista ventral. Nótese el flagelo sulcal (A, flecha) y ambos flagelos (B, flechas). **D-E**, células en vista dorsal. **C-E**, Observación de los cromosomas condensados típicos del dinocarion (= núcleo de dinoflagelados) (n, núcleo). **F**, cadena de 16 células. **G-H**, MEB. **G**, célula deformada vista desde el ápex. **H**, detalle de la Fig. 7.1G mostrando la acrobase en forma de herradura (H, flechas) y el contorno de las vesículas anfiesmales. Escala = 10 μm (A-G), 2 μm (H).

Gymnodinium impudicum (cepa LPCc044)

Referencias: Fraga *et al.* 1995: 515, Figs. 1–16 (como *Gyrodinium impudicum*); Daugbjerg *et al.* 2000: 305; Luo *et al.* 2018: 750, Fig. 7 A-G, Fig. 8 A-F.

Las células son de color amarillo-verdoso, con el epicono cónico e hipocono aplanado en especímenes solitarios (Fig. 7.2B,C) y de forma variable de acuerdo a la posición de la célula en la cadena (Fig. 7.2D). En células solitarias, el largo es de 29,4 a 41,6 μm (34,5

$\pm 1,1$) y el ancho de 20,1 a 30,4 μm ($24,9 \pm 0,9$) ($n = 27$). En células dispuestas en colonias, el largo celular es de 22,8 a 33,1 μm ($27,7 \pm 0,5$) y el ancho de 20,8 a 27,9 μm ($24,2 \pm 0,3$) ($n = 36$).

El cingulum es descendente, con un desplazamiento entre 1/3 y 1/4 de la longitud celular (Fig. 7.2A,B,D). El sulcus es estrecho, va desde el cingulum y penetra en el epicono hasta el antapex (Fig. 7.2D,E), prolongándose hacia el surco apical o acrobases (Fig. 7.2B,C,E, flechas blancas).

Las células tienen numerosos cloroplastos verdosos y una púsula esférica situada hacia el lado izquierdo del sulcus (Fig. 7.2A-C). El núcleo es central (Fig. 7.2C) y puede desplazarse ligeramente hacia el epicono o hipocono en células en cadena (no mostrado).

Las células se organizan en colonias, generalmente de cuatro células o dos células (Fig. 7.2D).

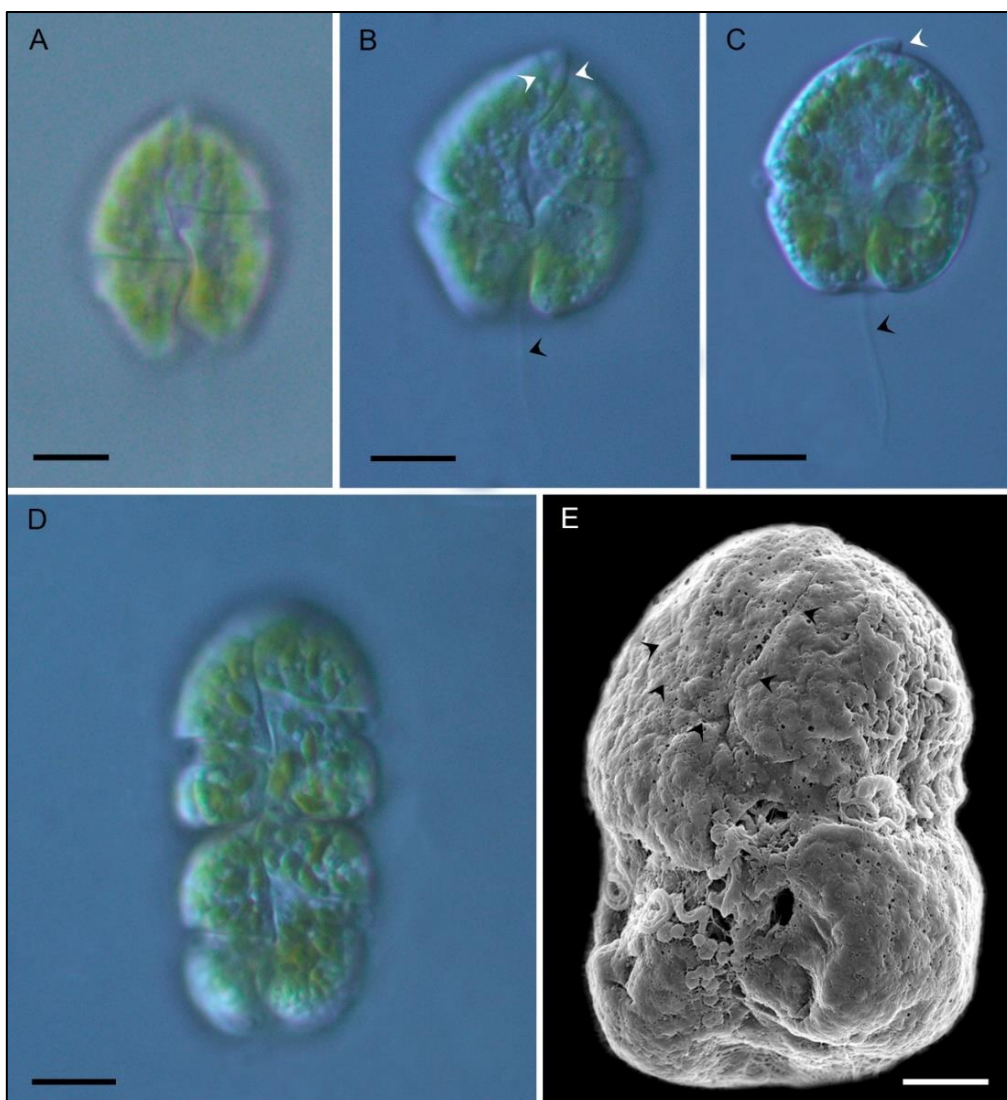


Fig. 7.2. *Gymnodinium impudicum* durante fase de crecimiento exponencial. **A-D**, MO. **A-B**, célula en vista ventral. Nótese flagelo sulcal (B, flecha negra) y surco apical o acrobases (B, flechas blancas). **C**, célula en vista dorsal. Nótese flagelo sulcal (flecha negra) y surco apical (flecha blanca). **D**, cadena formada por dos células en vista ventral. **E**, MEB. Célula en vista ventral lateralizada. Nótese la acrobases formada por la extensión del sulcus (flechas negras). Escala = 10 μm .

7.3.2 Ocurrencia de *Gymnodinium* en la bahía Samborombón

El género *Gymnodinium* estuvo presente solo en dos muestras, una correspondiente a las muestras colectadas desde embarcación y otra de muestras colectadas desde la costa. Ambas fueron colectadas en verano y la abundancia celular fue de $0,02 \times 10^4$ y $0,1 \times 10^4$ cél. l^{-1} , respectivamente.

La temperatura promedio del agua al momento de la colecta de las muestras en que *Gymnodinium* fue hallado fue de $22,7^\circ\text{C}$, con un mínimo de $21,8^\circ\text{C}$ y un máximo de $23,6^\circ\text{C}$, mientras que la salinidad promedio fue de $17,6$, con un mínimo de $15,2$ y un máximo de $20,0$.

7.3.3 Filogenia

El análisis de máxima verosimilitud (MV) y el de inferencia bayesiana (IB) mostraron la agregación de la secuencia correspondiente a la cepa LPCc043 en el clado de *G. catenatum* y la perteneciente a la cepa LPCc044 en el clado de *G. impudicum*, con un soporte de 99 % de Bootstrap y 1 de probabilidad posterior bayesiana, y de 100 % de Bootstrap y 1 de probabilidad posterior bayesiana, respectivamente (Fig. 7.3).

Los clados de *G. catenatum* y *G. impudicum* muestran que las secuencias argentinas presentan una distancia genética (distancia- p) de $0,001$ y $0,003$, respectivamente, respecto a las secuencias reportadas de otras áreas geográficas. La distancia- p entre ambos clados es de $0,237$.

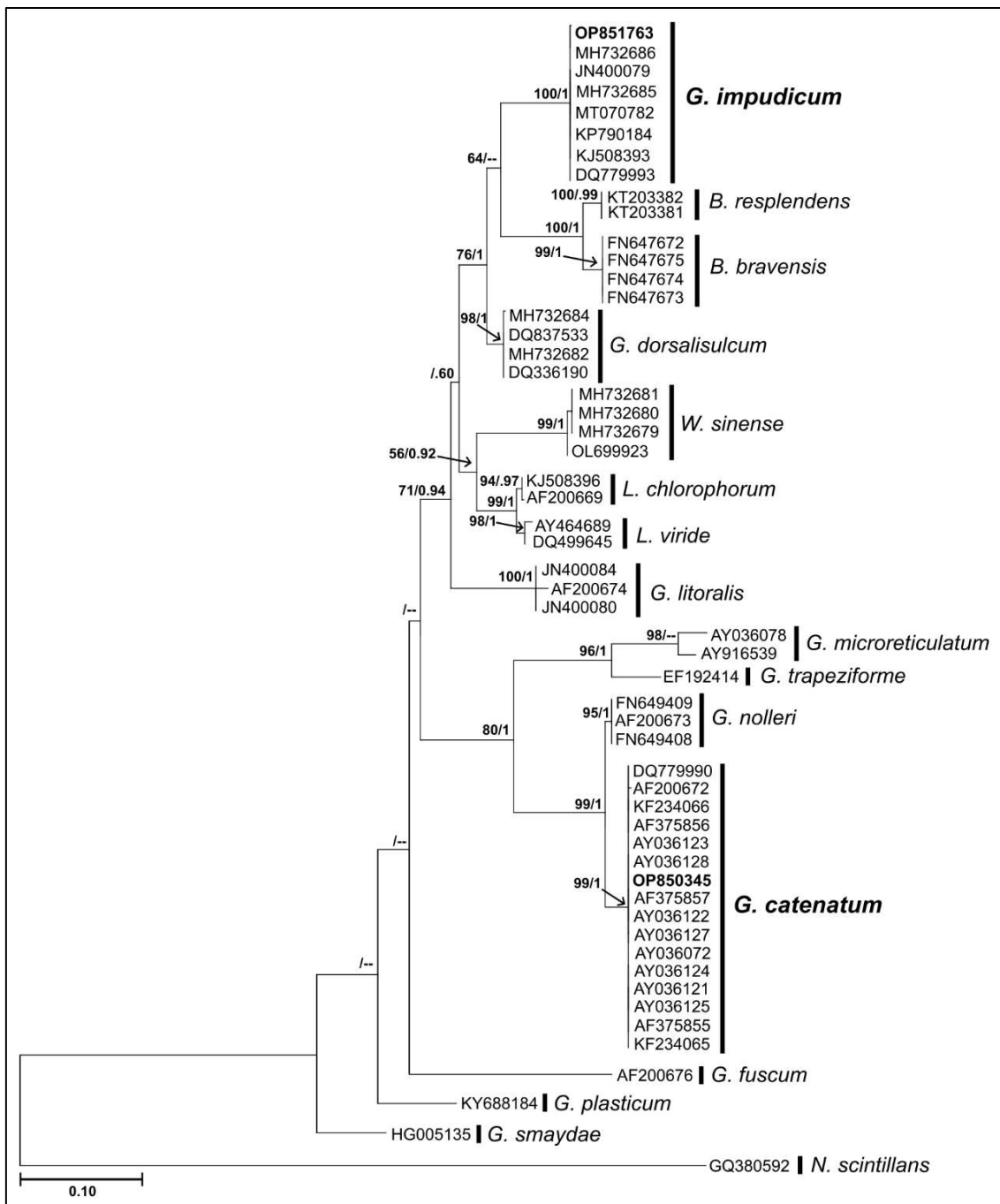


Fig. 7.3. Árbol de máxima verosimilitud (MV) a partir de la subunidad grande (LSU rADN) de las secuencias argentinas de *Gymnodinium* y de especies relacionadas. En negrita se encuentran las secuencias analizadas en este capítulo. El soporte de las ramas se muestra como MV/Inferencia bayesiana (IB). Sólo se muestran los valores >60% (MV) o >0,6 (IB).

7.3.4 Análisis de toxinas

Se encontraron toxinas PST en la cepa LPCc043 de *Gymnodinium catenatum* pero no en la cepa LPCc044 de *G. impudicum*.

El perfil de toxinas de *G. catenatum* estuvo dominado por N-sulfocarbamoil C1/C2 (55,8%), seguido por decarbamoil dcGTX2/dcGTX3 (42,7%) y con menor cantidad de GTX2 y GTX3 (1,5%) (Tabla 7.2). No fueron detectadas toxinas carbamato (STX, GTX1, GTX4), N-sulfocarbamoil (GTX5, GTX6) ni decarbamoil adicionales (dcSTX, dcNEO) (límite de detección < 0.01 μM). El contenido tóxico celular calculado fue de 17,8 fmol cél.⁻¹, y la toxicidad celular fue de 1,2 pg STX eq. cél.⁻¹ (Tabla 7.2).

Tabla 7.2. Perfil tóxico (mol%), contenido de toxinas (fmol cél.⁻¹) y toxicidad (pg STX eq. cél.⁻¹) de la cepa de *G. catenatum* proveniente de la bahía Samborombón. Referencias, Gonyautoxinas (GTXs); N-sulfocarbamoil toxinas (Cs); saxitoxinas (STX); NeoSTX (Neo); decarbamoil toxinas (dcGTXs, dcSTX, dcNeo); Nd, no detectado.

Toxina	Mol %	Contenido de toxina (fmol cél. ⁻¹)	Toxicidad (pg STX eq. cél. ⁻¹)
C1/C2	55,8	10	0,5
GTX1/GTX4	Nd	Nd	Nd
GTX2/GTX3	1,5	0,23	0,1
GTX5	Nd	Nd	Nd
GTX6	Nd	Nd	Nd
dcGTX2/dcGTX3	42,7	7,6	0,6
dcSTX	Nd	Nd	Nd
dcNeo	Nd	Nd	Nd
STX	Nd	Nd	Nd
Neo	Nd	Nd	Nd
Total	100	17,83	1,2

Adicionalmente, se detectaron dos compuestos sospechados de ser toxinas GC, con tiempos de retención más bajos que aquellos correspondientes a las soluciones estándar, lo que podría implicar que éstos son menos polares. Uno de estos compuestos presentó una señal con m/z 473<455, 393, 375, atribuible a GC1 o GC2, lo que no se pudo confirmar debido a la ausencia de soluciones de referencia estándar. La otra señal importante correspondió a la transición 393>375, que podría indicar GC6 o GC3a. Dado que la segunda transición de GC6 (393>273) también fue detectada y la de GC3a (393>257) no lo fue, el compuesto probablemente sería GC6.

6.4 – Discusión

Las especies marinas formadoras de cadenas *Gymnodinium catenatum* y *G. impudicum* fueron caracterizadas morfológicamente y diferenciadas entre sí en base al tamaño celular, desplazamiento del cingulum, número de células en la cadena y la relación sulcus-acrobase (Fraga *et al.*, 1995; Daugbjerg *et al.*, 2000). *G. catenatum* presentó células más grandes, un cingulum desplazado entre 1/5 y 1/6 de la longitud celular, mayor número de células en la colonia y una acrobase independiente del sulcus. En cambio, *G. impudicum* presentó células más pequeñas, con un cingulum desplazado entre 1/3 y 1/4 de la longitud celular, menor número de células en la colonia, y una acrobase formada por la extensión del sulcus alrededor del ápex. Las cepas argentinas de ambas especies mostraron diferencias de tamaño celular respecto a las descritas previamente por Graham (1943), Balech (1964), Fraga *et al.* (1995) y Daugbjerg *et al.* (2000), resultando consistentemente más grandes.

Los análisis filogenéticos revelaron la agrupación de las cepas argentinas LPCc043 y LPCc044 con los clados correspondientes a *G. catenatum* y *G. impudicum*, respectivamente. La distancia genética entre las secuencias argentinas y las secuencias de cepas aisladas del hemisferio norte y los altos valores de confiabilidad de los clados, respaldan las asignaciones taxonómicas de las especies. La topología filogenética ubicó a la secuencia de *G. catenatum* en el mismo subclado que *G. nolleri* M.Ellegaard & Moestrup, con un grupo hermano que agrupa a *G. trapeziforme* Attaran-Fariman & Bolch y *G. microreticulatum* C.J.S.Bolch & G.M.Hallegraeff. Una reconstrucción similar fue revelada previamente por Attaran-Fariman *et al.* (2007), Reñé *et al.* (2011) y Luo *et al.* (2018). Por otro lado, la secuencia OP851763 se agrupó de forma robusta (100% -1.0) con las secuencias de *G. impudicum*. En este caso, el clado de *G. impudicum* se situó en el mismo subclado que *Barrufeta bravensis* y *B. respiciens* (Hulburt) H.Gu, Z.Luo & K.N.Mertens, en concordancia con los hallazgos de Reñé *et al.* (2011), Gu *et al.* (2015), y Luo *et al.* (2018).

El perfil de toxinas de *G. catenatum* resultó similar al determinado por Montoya *et al.* (2006) a partir de una muestra de agua marina tomada frente a Mar del Plata (Argentina), excepto por la presencia de GTX4 en esta última, ausente en la cepa estudiada en este trabajo. En ambos perfiles no se encontraron GTX5, GTX6 y STX. Las proporciones de cada toxina en términos molares resultaron diferentes: la cepa

argentina LPCc043 presentó menores cantidades de C1/C2 y GTX2/GTX3, y mayores cantidades de dcGTX2/dcGTX3 que el material analizado por Montoya *et al.* (2006). Adicionalmente, en la cepa LPCc043 fueron hallados compuestos atribuibles a GC1 o GC2 y GC6, que no fueron informados por Montoya *et al.* (2006). En este trabajo no fue posible confirmar la presencia de C3/C4 debido a la ausencia de soluciones estándar. Esto limita la comparación con el perfil descrito por Montoya *et al.* (2006), carente de ambos análogos, que han sido hallados frecuentemente en cepas de otras regiones del mundo (Hallegraeff *et al.*, 2012). El contenido tóxico calculado para esta cepa fue de 17,8 fmol cél.⁻¹, notablemente menor al determinado por Montoya *et al.* (2006; 122 fmol cél.⁻¹), pero dentro de los rangos informados por Negri *et al.* (2007, Tabla 2) para cepas provenientes de otras regiones geográficas con perfiles tóxicos diversos. La variación intrapoblacional y regional en los perfiles de toxinas para esta especie ya ha sido demostrada (Hallegraeff *et al.*, 2012 y referencias ahí), y éstas podrían deberse a factores como el origen geográfico de las cepas, variables ambientales o las condiciones de cultivo (temperatura, medio de cultivo y fase de crecimiento) (Band-Schmidt *et al.*, 2006). Finalmente, nuestros resultados confirmaron que *G. impudicum* es una especie no toxígena, coincidiendo con los hallazgos de Fraga *et al.* (1995).

Este estudio brinda el primer registro de *G. impudicum* para Argentina y para el Atlántico Sudoccidental, el primer estudio morfológico y filogenético realizado en base a cultivos de *G. catenatum* y *G. impudicum* en Argentina, la determinación de que ambas especies coexisten en la bahía Samborombón, el primer perfil toxicológico de *G. catenatum* sobre la base de material cultivado y la confirmación de que *G. impudicum* es una especie no tóxica.

Capítulo 8

Conclusiones generales

En este trabajo se analizaron 148 muestras de fitoplancton provenientes de distintos sectores de la bahía Samborombón, una región previamente poco estudiada del estuario del Río de la Plata. Las muestras fueron colectadas desde embarcaciones entre 2016 y 2018, y desde el litoral en cuatro puntos costeros desde 2019 a 2021, abarcando las distintas estaciones del año. Los principales hallazgos de esta tesis comprenden la caracterización de la composición y dinámica espacio-temporal del fitoplancton, junto con la detección y el análisis morfológico, molecular y citotóxico de tres especies ictiotóxicas previamente no estudiadas en Argentina. Además, se investigaron dos especies de *Gymnodinium*, una de las cuales ha sido asociada con eventos de mortandad de peces. Estos resultados permitieron alcanzar los objetivos planteados y respaldar la hipótesis general de la tesis.

El análisis de las muestras cuantitativas provenientes de ambos muestreos reveló valores anuales de abundancia y biomasa fitoplanctónica ($1,7 \times 10^6$ cél. l⁻¹ y 108,3 µg C l⁻¹, respectivamente) comparables o mayores con los encontrados en la literatura para otras regiones del estuario, con un incremento durante la primavera y el verano. A pesar de que el frente de turbidez característico del área reduce la zona fótica y convierte a la luz en un factor limitante para el fitoplancton, es probable que el continuo aporte de nutrientes del Río de la Plata, junto con los canales y ríos tributarios a la bahía, generen una gran acumulación de microalgas.

Los resultados de esta tesis muestran que las microalgas con mayores biovolúmenes son dominantes, especialmente aquellas capaces de formar cadenas u otro tipo de colonias. Estos tipos morfológicos confieren una mayor superficie celular para absorber luz. Además, se cuantificaron numerosos taxa de fitoflagelados de pequeño tamaño, capaces de migrar en la columna de agua hacia zonas más favorables para su desarrollo.

Los análisis sugieren que las asociaciones fitoplanctónicas en la bahía son homogéneas espacialmente, exceptuando algunos grupos que presentan una mayor

afinidad por condiciones particulares, como los dinoflagelados que se asociaron positivamente con la salinidad.

El análisis cualitativo de las muestras provenientes de ambas campañas permitió ampliar el conocimiento florístico de la región al identificar 266 taxa, de los cuales 254 pudieron ser determinados a nivel de género o especie. Los mismos han sido incluidos en un listado florístico para la bahía Samborombón (Capítulo 9, Anexo 8), que incluye 113 diatomeas, 60 clorofíceas, 37 dinoflagelados, 26 cianobacterias, 10 euglenofíceas, 3 rafidofíceas, 2 dictiocofíceas, 2 prasinofíceas y 1 primnesiofícea. Cabe destacar que muchas especies no pudieron ser identificadas debido a su deformación o destrucción producto de los métodos de fijación. Además, numerosos taxa de pequeño tamaño (dinoflagelados, fitoflagelados) son de difícil tratamiento para su posterior observación al MEB. Por estas razones, es probable que este listado, complementario de los encontrados en la literatura para otras regiones del estuario, represente solo una fracción de la diversidad fitoplanctónica de la bahía Samborombón.

En cuanto a las especies ictiotóxicas, las evidencias presentadas en esta tesis demuestran la presencia de tres especies pertenecientes a la Clase Raphidophyceae. Como se ha discutido en los Capítulos 4, 5 y 6, los géneros *Chattonella* B.Biecheler, *Fibrocapsa* S.Toriumi & Takano y *Heterosigma* Y.Hada ex Y.Hara & M.Cihara, son los más frecuentes en ambientes marinos y han sido reportados en la literatura como productores de Floraciones Algales Nocivas (FAN) en diferentes partes del mundo. Los resultados de esta tesis brindan la primera descripción para Argentina de especies pertenecientes a los tres géneros mencionados y amplían su distribución a aguas templadas del Atlántico sudoccidental (Fig. 8.1).

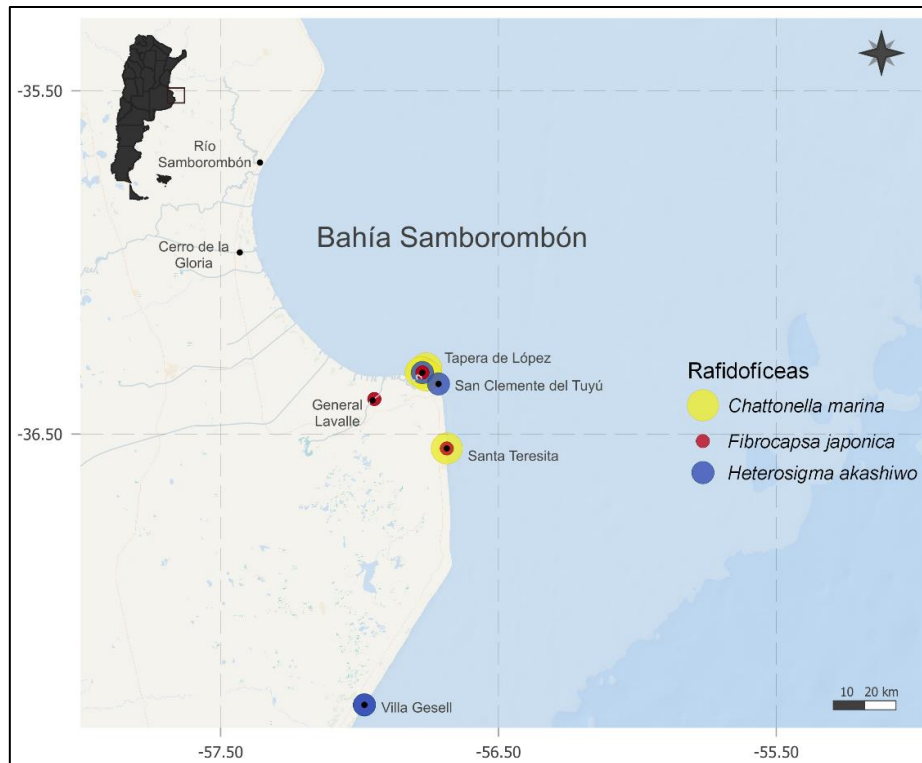


Fig. 8.1. Distribución de las cepas de *Chattonella marina*, *Fibrocapsa japonica* y *Heterosigma akashiwo* en la bahía Samborombón y aguas costeras de la Provincia de Buenos Aires.

Las especies halladas pertenecientes a la Clase Raphidophyceae fueron *Chattonella marina*, *Fibrocapsa japonica* y *Heterosigma akashiwo*. Estas formaron parte del fitoplancton del área y fueron registradas tanto en el estuario como en aguas costeras de la Provincia de Buenos Aires. Es relevante destacar que, dentro del estuario, las mismas solo fueron registradas al sur de la bahía, donde los valores de salinidad fueron mayores.

Las células de las tres especies son extremadamente frágiles y se deforman o destruyen fácilmente. En este estudio, prácticamente no se cuantificaron rafdofíceas en las campañas realizadas desde embarcación probablemente debido a la destrucción celular producida por el uso de fijadores. Las muestras colectadas durante las campañas realizadas desde la costa fueron observadas *in vivo*, lo que permitió realizar un análisis morfológico adecuado, establecer cómo se deformaban las células luego del agregado del fijador y, con esa información, cuantificarlas. Sin embargo, es necesario un ojo experimentado para su identificación, lo que podría introducir un sesgo en el análisis de las muestras cuantitativas. Los cultivos representan, entonces, una herramienta esencial para trabajar con estos organismos. El aislamiento y cultivo de las cepas encontradas

permitió realizar análisis moleculares, los cuales, como se discutió en los Capítulos 4, 5 y 6, son indispensables para la determinación fehaciente de las especies de este grupo. Los estudios filogenéticos realizados a partir de la subunidad grande del ADN ribosómico (LSU rADN) permitieron confirmar la identidad de las especies. En general, las distancias genéticas entre las cepas estudiadas pertenecientes a una misma especie fueron muy bajas y las secuencias obtenidas prácticamente iguales, exceptuando una cepa de *Fibrocapsa japonica* (Capítulo 5, sección 5.3.3). Para investigar las diferencias entre cepas provenientes de una misma o de diferentes regiones geográficas, sería necesario complementar estos análisis con el estudio de otras regiones del ADN con tasas de mutación más altas.

Los análisis de pigmentos realizados en cada especie permitieron ampliar el conocimiento sobre las cepas sudamericanas, y revelaron que existe una gran variabilidad en la composición y concentración de pigmentos entre diferentes cepas de una misma especie (discutidas en los Capítulos 4, 5 y 6). Estas diferencias podrían estar relacionadas con el estado fisiológico de las cepas, el tratamiento previo al momento del análisis y las condiciones de cultivo, entre otros factores. En esta tesis, todas las cepas obtenidas de las tres especies halladas fueron cultivadas y analizadas bajo las mismas condiciones, por lo que las diferencias encontradas podrían reflejar particularidades de cada una de ellas. Por otro lado, el análisis de la composición pigmentaria no permitió identificar patrones distintivos entre las especies estudiadas, sino un patrón generalizado de la Clase Raphidophyceae. Este grupo se caracteriza por la presencia de Clorofila-*a* y fucoxantina como pigmentos mayoritarios, junto con Clorofila-*c* y otros carotenoides en menores proporciones, y este patrón fue hallado en todas las cepas (Tabla 8.1).

Tabla 8.1. Composición pigmentaria de todas las cepas de *Chattonella marina*, *Fibrocapsa japonica* y *Heterosigma akashiwo* analizadas en esta tesis. Los resultados se expresan en pg cél.⁻¹. Referencias, Chl-*a*, clorofila-*a*; Chl-*c1*, clorofila-*c1*; Chl-*c2*, clorofila-*c2*; Fuc, fucoxantina; Viol, violaxantina; Alo, aloxantina; Ant, anteraxantina; Dd, diadinoxantina; Dt, diatoxantina; β , β -caroteno; Zea, zeaxantina; –, no detectado.

Especie	Cepa	Chl- <i>a</i>	Chl- <i>c1</i>	Chl- <i>c2</i>	Fuc	Viol	Alo	Ant	Dd	Dt	β	Zea
<i>C. marina</i>	LPCc045	196,7	–	9,07	44,0	9,1	–	4,2	–	–	5,9	4,8
<i>C. marina</i>	LPCc046	56,3	1,9	1,9	10,6	1,4	–	–	–	–	1,7	1,5

<i>C. marina</i>	LPCc047	23,9	1,6	0,9	6,1	0,4	0,5	0,3	–	1,8	1,1	1,3
<i>F. japonica</i>	LPCc049	62,3	4,8	7,6	38,4	2,7	–	1,1	–	–	0,9	0,6
<i>H. akashiwo</i>	LPCc056	296,3	–	31,5	118,2	9,8	–	9,5	–	–	7,4	8,9
<i>H. akashiwo</i>	LPCc057	123,9	–	9,1	32,5	3,0	–	–	–	–	2,9	–

Las rafidofíceas halladas fueron registradas en primavera, verano y otoño temprano, bajo diferentes escenarios de temperatura y salinidad (Fig. 8.2). Como se analizó en el Capítulo 3, estas variables presentan grandes fluctuaciones en la bahía, incluso dentro de una misma estación (Capítulo 3, Fig. 3.10). Estudiar las tasas de crecimiento (μ) bajo condiciones controladas permitiría prever qué condiciones de temperatura y salinidad podrían favorecer el crecimiento de estas especies en el estuario.

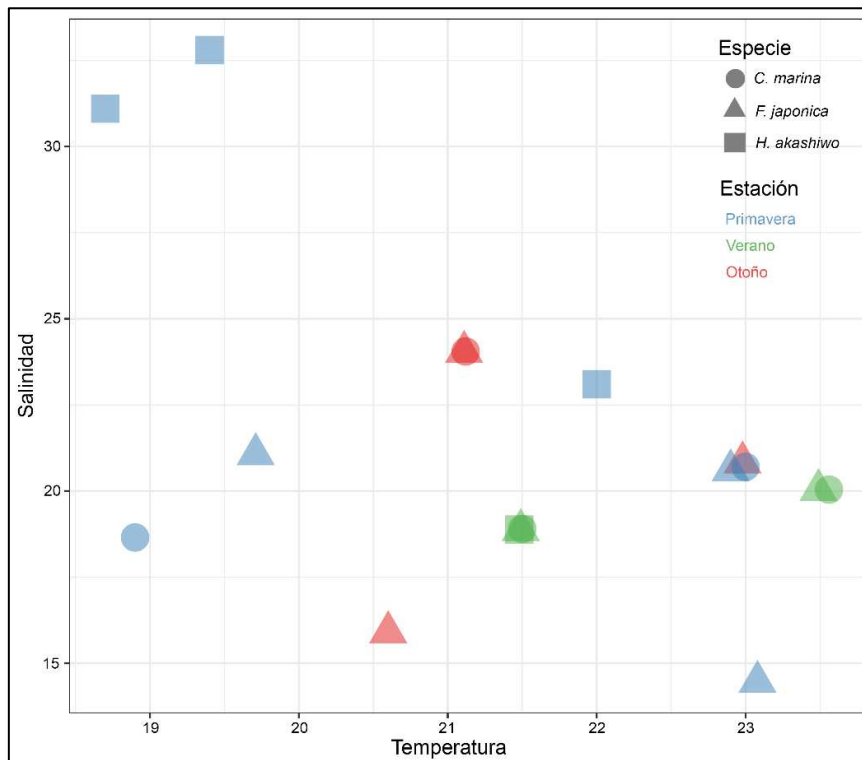


Fig. 8.2. Condiciones de temperatura y salinidad en las cuales se hallaron las especies *Chattonella marina* (círculos), *Fibrocapsa japonica* (triángulos) y *Heterosigma akashiwo* (cuadrados). Los colores representan las estaciones del año (celeste = primavera; verde = verano; rojo = otoño).

A partir del estudio de μ de distintas cepas de *C. marina*, *F. japonica* y *H. akashiwo* bajo diferentes condiciones de temperatura y salinidad (15 y 18 °C; salinidades de 20, 25 y 30), se concluyó que son eurihalinas y euritermas, similar a lo que sucede con otras

cepas de las mismas especies en distintas regiones del mundo, que también han mostrado adaptabilidad a estas variables. Además, se observó una considerable variabilidad intraespecífica de las condiciones bajo las cuales las especies alcanzaron los mayores valores de μ (Fig. 8.3). Algunas cepas, como LPCc046 y LPCc047 de *C. marina* y LPCc031 de *H. akashiwo*, se beneficiaron tanto del aumento de temperatura como de salinidad, mientras que las cepas LPCc045 de *C. marina*, LPCc051 y LPCc049 de *F. japonica* no mostraron una tendencia definida (Fig. 8.3). Aunque las condiciones de temperatura testeadas fueron inferiores a los valores medidos en el agua al momento de tomar las muestras de donde se aislaron las cepas (Fig. 8.2), estos experimentos permitieron ampliar el conocimiento sobre su comportamiento fisiológico y sirven como información de base para futuros estudios. El crecimiento de una especie no sólo está limitado por la temperatura y salinidad; como se ha discutido en esta tesis, la disponibilidad de luz, nutrientes y otros factores cumplen un rol crucial para el desarrollo. No obstante, este tipo de ensayos permiten analizar rangos de condiciones que podrían favorecer el desarrollo de una floración.

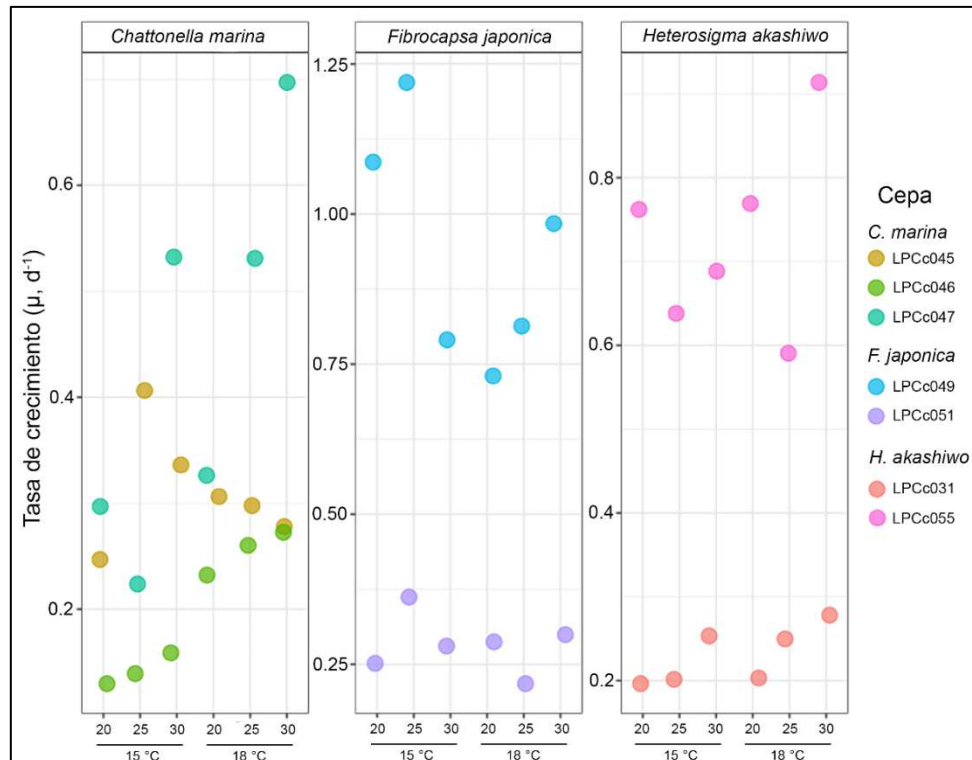


Fig. 8.3. Tasas de crecimiento máximas (μ , d^{-1}) de distintas cepas pertenecientes a las especies *Chattonella marina*, *Fibrocapsa japonica* y *Heterosigma akashiwo* bajo distintas condiciones de temperatura (15 y 18 °C) y salinidad (20, 25 y 30) obtenidas en los experimentos de los Capítulos 4, 5 y 6, respectivamente.

En esta tesis se realiza la primera evaluación del potencial citotóxico de microalgas de la bahía Samborombón utilizando líneas celulares. El uso de esta metodología ha ido aumentando en el último tiempo por razones éticas, ya que evita trabajar con peces vivos, además de ofrecer otras ventajas como un mejor control de las condiciones experimentales. Las branquias de los peces son un órgano clave en los ecosistemas acuáticos ya que en ellas ocurren procesos vitales como el intercambio gaseoso, la osmorregulación, la difusión iónica, la regulación del pH y el balance del nitrógeno. Como se ha visto en la Introducción de los Capítulos 4, 5 y 6, la mayoría de las hipótesis sobre el modo de acción de la ictiotoxicidad en la Clase Raphidophyceae se centran en un desbalance en este órgano.

Para evaluar el potencial citotóxico de las cepas de las tres especies se realizaron bioensayos con las líneas celulares RTgill–W1, utilizando como tratamientos microalgas lisadas (intracelular) e intactas (sobrenadante). Los resultados obtenidos mostraron que las tres especies analizadas presentan potencial citotóxico y disminuyeron la viabilidad de las RTgill–W1, observándose variabilidad intraespecífica. En general, el tratamiento sobrenadante mostró mayor efecto tóxico que el intracelular. Esto sugiere que las células liberan activamente metabolitos y sustancias nocivas al medio. Las diferencias en la citotoxicidad entre las cepas argentinas y las de otras regiones podrían estar relacionadas con factores como las condiciones de cultivo (por ejemplo, la irradiancia, los medios de cultivo utilizados, la temperatura), las concentraciones microalgales utilizadas, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), o la posible producción de metabolitos citotóxicos aún no identificados. Los resultados de la literatura consultada en las distintas especies analizadas sugieren que las ROS tienen un rol importante en la citotoxicidad. La producción de ROS en las cepas argentinas se analizó únicamente en *Chattonella marina* (Capítulo 4, sección 4.3.7) y los valores medidos fueron similares entre tratamientos (intracelular y sobrenadante) y comparables o inferiores a los reportados en la literatura, por lo que la producción de ROS no explica por sí sola la mayor citotoxicidad en el tratamiento sobrenadante al medir la viabilidad de las RTgill–W1. Esto subraya la necesidad de analizar y caracterizar la producción de otros compuestos, como los PUFAs, para entender con mayor precisión los mecanismos de citotoxicidad y explicar las diferencias en el potencial citotóxico entre cepas de una misma especie.

La comparación de la concentración letal 50 (LC50) proveniente de diferentes ensayos presenta limitaciones debido a que la citotoxicidad puede variar según las condiciones de cultivo (medio de cultivo, irradiancia, temperatura, salinidad, entre otros) y la fase de crecimiento al momento del experimento, pero representa una primera aproximación de las concentraciones microalgales que resultan tóxicas para las líneas celulares RTgill–W1. A partir del cálculo de LC50, se pudo establecer que la cepa más tóxica de las investigadas fue LPCc047 (*C. marina*), seguida por la LPCc049 (*F. japonica*) y las LPCc055 y LPCc057 (*H. akashiwo*) para el tratamiento sobrenadante (Fig. 8.4).

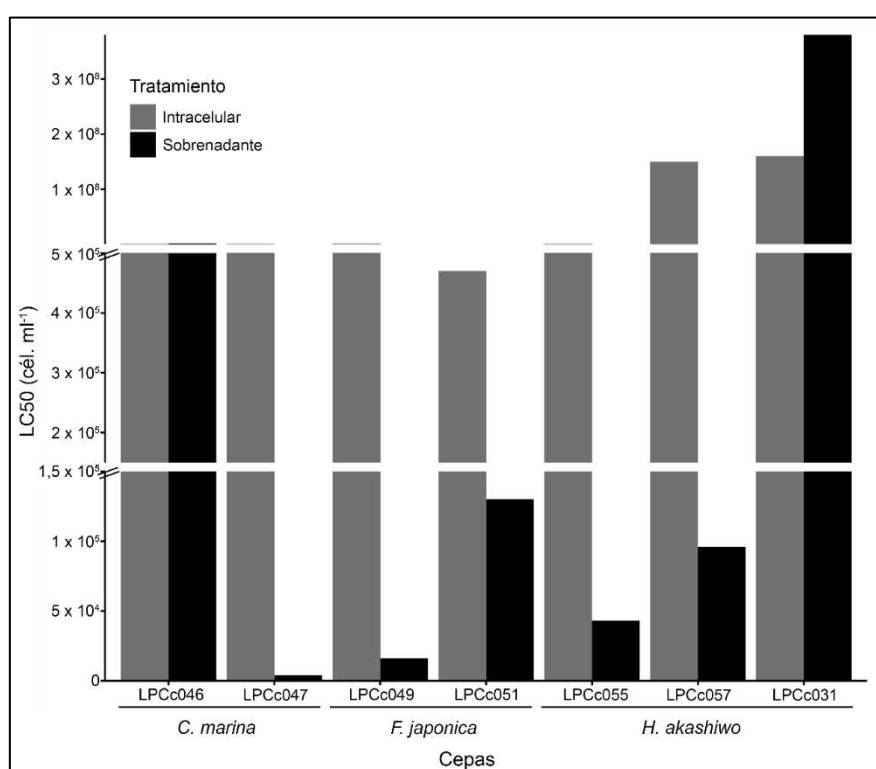


Fig. 8.4. Valores de concentración letal media (LC50, en cél. ml⁻¹) de las cepas pertenecientes a las especies *Chattonella marina* (LPCc046 y LPCc047), *Fibrocapsa japonica* (LPCc049 y LPCc051) y *Heterosigma akashiwo* (LPCc055, LPCc057 y LPCc031) calculados a partir de los ensayos con RTgill–W1 para los tratamientos intracelular (gris) y sobrenadante (negro) realizados en los Capítulos 4, 5 y 6, respectivamente. Las líneas horizontales paralelas en el eje y indican interrupciones en el mismo.

En esta tesis se presenta el primer análisis en base a la morfología, filogenia y toxinología de cepas de *Gymnodinium catenatum* y *G. impudicum* provenientes de la bahía Samborombón. *G. catenatum* había sido citada previamente en el estuario del Río de la Plata, generalmente vinculada a la costa uruguaya. Su registro en este trabajo ha

sido en verano, coincidente con lo reportado en la literatura. En cambio, *G. impudicum* no había sido previamente citada para aguas argentinas y del Atlántico Sudoccidental, constituyendo ésta la primera cita de la especie para la región.

Estas especies pueden confundirse fácilmente ya que ambas forman cadenas y presentan una morfología similar. A partir de la caracterización morfológica realizada se pudieron determinar caracteres para facilitar su identificación bajo microscopía óptica tales como el tamaño celular, el desplazamiento del cingulum, el largo de la cadena y la relación sulcus-acrobase.

Este estudio presenta las primeras secuencias de LSU rADN de *G. catenatum* y *G. impudicum* de Argentina (Capítulo 7). La reconstrucción filogenética realizada fue coincidente con las de la literatura y confirmó que las cepas pertenecen a dos clados diferentes separados con una amplia distancia genética, dentro de un género polifilético.

Los análisis de toxinas realizados en ambas especies confirmaron que *G. impudicum* no es toxigena, coincidente con lo reportado en la literatura, y que el perfil de toxinas de la cepa de *G. catenatum* estuvo dominado por N-sulfocarbamoil C1/C2 (55,8%), seguido por decarbamoil dcGTX2/dcGTX3 (42,7%) y con menor cantidad de GTX2 y GTX3 (1,5%). Adicionalmente, se detectaron compuestos sospechados de ser toxinas GC, que no pudieron confirmarse debido a la ausencia de soluciones estándar. El contenido tóxico calculado de *G. catenatum* presentó una menor toxicidad respecto a otras cepas procedentes de otras regiones geográficas, tanto de la Provincia de Buenos Aires como de otras partes del mundo.

Ambas especies han sido observadas como productoras de mareas rojas, pero solo *G. catenatum* ha generado eventos de envenenamiento paralizante de moluscos con pérdidas de vidas humanas, y ha sido asociada a una extensiva mortandad de peces en una ocasión. Desafortunadamente, la cepa obtenida en este trabajo no alcanzó la biomasa necesaria para realizar ensayos de citotoxicidad, por lo que permanece pendiente analizar su potencial citotóxico a partir de bioensayos con RTgill-W1 utilizando, además de los tratamientos intracelular y sobrenadante, los extractos de las toxinas halladas para establecer si se trata de una especie con potencial ictiotóxico.

Los resultados del presente trabajo de tesis sirven como una línea de base en lo que respecta al conocimiento de la composición florística de microalgas de la región

bahía Samborombón y su dinámica espacio-temporal, así como de la caracterización de especies ictiotóxicas pertenecientes a la Clase Raphidophyceae que no habían sido estudiadas previamente en Argentina.

Capítulo 9

Anexos

Anexo 1. Área comprendida desde la costa hasta las 7 millas náuticas: Código de muestreo, códigos de muestras, fecha y ubicación geográfica de los sitios donde se tomaron las 66 muestras analizadas en el Capítulo 3. Se incluye la clasificación según la ubicación (latitudinal y longitudinal) y según el grupo de estaciones en donde fueron colectadas (P/V = primavera/verano; O/I = otoño/invierno). Las muestras se encuentran ordenadas cronológicamente.

Código de muestra	Fecha de muestro	Latitud (S)	Longitud (O)	Código latitudinal	Código longitudinal	Grupo estacional
40	29-2-16	-36.3022	-56.8548	Sur	Siete millas	P/V
44	29-2-16	-36.2240	-56.8343	Sur	Línea de costa	P/V
1	7-3-16	-36.1232	-57.1047	Centro	Siete millas	P/V
49	7-3-16	-36.1836	-57.1844	Centro	Línea de costa	P/V
3	8-3-16	-35.9438	-57.3475	Centro	Línea de costa	P/V
55	8-3-16	-35.9152	-57.2433	Centro	Siete millas	P/V
4	13-3-16	-35.6777	-57.1450	Norte	Siete millas	P/V
62	13-3-16	-35.6356	-57.2351	Norte	Línea de costa	P/V
64	29-3-16	-36.3155	-56.7307	Sur	Línea de costa	O/I
5	29-3-16	-36.2820	-56.6840	Sur	Siete millas	O/I
51	12-6-16	-36.2243	-56.8337	Sur	Siete millas	O/I
54	12-6-16	-36.3717	-56.9207	Sur	Canal	O/I
56	14-6-16	-36.1687	-57.0321	Centro	Siete millas	O/I
57	14-6-16	-36.1285	-57.0943	Centro	Siete millas	O/I
9	14-6-16	-36.1823	-57.1845	Centro	Línea de costa	O/I
60	14-6-16	-36.2895	-57.1204	Centro	Canal	O/I
65	16-6-16	-35.9705	-57.3968	Centro	Canal	O/I
67	17-6-16	-35.6372	-57.2345	Norte	Línea de costa	O/I
68	17-6-16	-35.6697	-57.1415	Norte	Siete millas	O/I
70	18-6-16	-35.9435	-57.3472	Centro	Línea de costa	O/I
73	18-6-16	-35.9167	-57.2380	Centro	Siete millas	O/I
111	19-7-16	-36.2807	-56.6897	Sur	Siete millas	O/I

114	19-7-16	-36.3098	-56.7300	Sur	Línea de costa	O/I
8	17-9-16	-36.3004	-56.8455	Sur	Línea de costa	P/V
132	17-9-16	-36.3785	-56.9254	Sur	Canal	P/V
135	17-9-16	-36.2266	-56.8297	Sur	Siete millas	P/V
137	19-9-16	-36.2897	-57.1208	Centro	Canal	P/V
138	19-9-16	-36.1912	-57.2003	Centro	Línea de costa	P/V
139	19-9-16	-36.1233	-57.1000	Centro	Siete millas	P/V
145	21-9-16	-35.9713	-57.4083	Centro	Canal	P/V
147	25-9-16	-35.9412	-57.3487	Centro	Línea de costa	P/V
150	25-9-16	-35.6357	-57.2451	Norte	Línea de costa	P/V
151	25-9-16	-35.6736	-57.1476	Norte	Siete millas	P/V
154	25-9-16	-35.9166	-57.2449	Centro	Siete millas	P/V
163	6-10-16	-36.1871	-56.4424	Sur	Siete millas	P/V
165	6-10-16	-36.1723	-56.4092	Sur	Siete millas	P/V
131	18-12-16	-36.2802	-56.7127	Sur	Siete millas	P/V
2	12-1-17	-36.1238	-57.1023	Centro	Siete millas	P/V
13	12-1-17	-36.2903	-57.1213	Centro	Canal	P/V
6	14-1-17	-36.2248	-56.8327	Sur	Siete millas	P/V
12	14-1-17	-36.3665	-56.9200	Sur	Canal	P/V
16	18-1-17	-35.6773	-57.1445	Norte	Siete millas	P/V
19	18-1-17	-35.9148	-57.2428	Centro	Siete millas	P/V
43	18-3-17	-35.9150	-57.2420	Centro	Siete millas	O/I
45	18-3-17	-35.9710	-57.4000	Centro	Canal	O/I
48	19-3-17	-35.6787	-57.1465	Norte	Siete millas	O/I
58	23-3-17	-36.3693	-56.9207	Sur	Canal	O/I
61	23-3-17	-36.2252	-56.8310	Sur	Siete millas	O/I
63	24-3-17	-36.2880	-57.1190	Centro	Canal	O/I
11	6-8-17	-36.1270	-57.1060	Centro	Siete millas	O/I
149	6-8-17	-36.3572	-56.9198	Sur	Canal	O/I
153	7-8-17	-36.2250	-56.8330	Sur	Siete millas	O/I
168	16-8-17	-35.6757	-57.1428	Norte	Línea de costa	O/I
14	12-3-18	-36.2135	-56.9503	Sur	Siete millas	P/V
15	12-3-18	-36.2255	-56.8327	Sur	Siete millas	P/V
17	12-3-18	-36.1250	-57.1010	Centro	Siete millas	P/V
18	22-3-18	-35.6760	-57.1468	Norte	Línea de costa	P/V
66	26-3-18	-35.9712	-57.4057	Centro	Canal	P/V
20	26-3-18	-35.9193	-57.2403	Centro	Siete millas	P/V
81	13-8-18	-35.6787	-57.1462	Norte	Siete millas	O/I

85	15-8-18	-35.9713	-57.4098	Centro	Canal	O/I
88	15-8-18	-35.9187	-57.2415	Centro	Siete millas	O/I
90	21-8-18	-36.2815	-57.1160	Centro	Canal	O/I
93	21-8-18	-36.1250	-57.1013	Centro	Siete millas	O/I
96	21-8-18	-36.2257	-56.8335	Sur	Siete millas	O/I
100	21-8-18	-36.3655	-56.9200	Sur	Canal	O/I

Anexo 2. Campañas realizadas desde la costa: Códigos de muestras, fecha y ubicación geográfica de los sitios donde se tomaron las 82 muestras analizadas en el Capítulo 3, junto con la estación en la que se consideró a cada una. Las muestras se encuentran ordenadas cronológicamente.

Código de muestra	Fecha de muestreo	Sitio de muestreo	Latitud (S)	Longitud (O)	Estación
TL1	31-8-19	Tapera de López	-36.321863	-56.77375	Invierno
GL1	31-8-19	General Lavalle	-36.398706	-56.946798	Invierno
CG1	31-8-19	Cerro de la Gloria	-35.971921	-57.446353	Invierno
RS1	31-8-19	Río Samborombón	-35.710905	-57.358154	Invierno
TL2	21-9-19	Tapera de López	-36.321863	-56.77375	Primavera
GL2	21-9-19	General Lavalle	-36.398706	-56.946798	Primavera
CG2	21-9-19	Cerro de la Gloria	-35.971921	-57.446353	Primavera
RS2	21-9-19	Río Samborombón	-35.710905	-57.358154	Primavera
TL3	26-10-19	Tapera de López	-36.321863	-56.77375	Primavera
GL3	26-10-19	General Lavalle	-36.398706	-56.946798	Primavera
CG3	26-10-19	Cerro de la Gloria	-35.971921	-57.446353	Primavera
RS3	26-10-19	Río Samborombón	-35.710905	-57.358154	Primavera
TL4	16-11-19	Tapera de López	-36.321863	-56.77375	Primavera
GL4	16-11-19	General Lavalle	-36.398706	-56.946798	Primavera
CG4	16-11-19	Cerro de la Gloria	-35.971921	-57.446353	Primavera
RS4	16-11-19	Río Samborombón	-35.710905	-57.358154	Primavera
TL5	15-12-19	Tapera de López	-36.321863	-56.77375	Primavera
GL5	15-12-19	General Lavalle	-36.398706	-56.946798	Primavera
CG5	15-12-19	Cerro de la Gloria	-35.971921	-57.446353	Primavera
RS5	15-12-19	Río Samborombón	-35.710905	-57.358154	Primavera
TL6	26-1-20	Tapera de López	-36.321863	-56.77375	Verano
GL6	26-1-20	General Lavalle	-36.398706	-56.946798	Verano
CG6	26-1-20	Cerro de la Gloria	-35.971921	-57.446353	Verano
RS6	26-1-20	Río Samborombón	-35.710905	-57.358154	Verano
TL7	14-2-20	Tapera de López	-36.321863	-56.77375	Verano
GL7	14-2-20	General Lavalle	-36.398706	-56.946798	Verano
CG7	14-2-20	Cerro de la Gloria	-35.971921	-57.446353	Verano
RS7	14-2-20	Río Samborombón	-35.710905	-57.358154	Verano
TL8	15-3-20	Tapera de López	-36.321863	-56.77375	Verano

GL8	15-3-20	General Lavalle	-36.398706	-56.946798	Verano
CG8	15-3-20	Cerro de la Gloria	-35.971921	-57.446353	Verano
RS8	15-3-20	Río Samborombón	-35.710905	-57.358154	Verano
TL9	5-12-20	Tapera de López	-36.321863	-56.77375	Primavera
GL9	5-12-20	General Lavalle	-36.398706	-56.946798	Primavera
CG9	5-12-20	Cerro de la Gloria	-35.971921	-57.446353	Primavera
RS9	5-12-20	Río Samborombón	-35.710905	-57.358154	Primavera
TL10	17-1-21	Tapera de López	-36.321863	-56.77375	Verano
GL10	18-1-21	General Lavalle	-36.398706	-56.946798	Verano
CG10	18-1-21	Cerro de la Gloria	-35.971921	-57.446353	Verano
RS10	18-1-21	Río Samborombón	-35.710905	-57.358154	Verano
TL11	28-2-21	Tapera de López	-36.321863	-56.77375	Verano
GL11	28-2-21	General Lavalle	-36.398706	-56.946798	Verano
CG11	28-2-21	Cerro de la Gloria	-35.971921	-57.446353	Verano
RS11	28-2-21	Río Samborombón	-35.710905	-57.358154	Verano
TL12	29-3-21	Tapera de López	-36.321863	-56.77375	Otoño
GL12	29-3-21	General Lavalle	-36.398706	-56.946798	Otoño
RS12	29-3-21	Río Samborombón	-35.710905	-57.358154	Otoño
TL13	18-4-21	Tapera de López	-36.321863	-56.77375	Otoño
GL13	18-4-21	General Lavalle	-36.398706	-56.946798	Otoño
CG13	18-4-21	Cerro de la Gloria	-35.971921	-57.446353	Otoño
RS13	18-4-21	Río Samborombón	-35.710905	-57.358154	Otoño
TL14	16-5-21	Tapera de López	-36.321863	-56.77375	Otoño
GL14	16-5-21	General Lavalle	-36.398706	-56.946798	Otoño
CG14	16-5-21	Cerro de la Gloria	-35.971921	-57.446353	Otoño
RS14	16-5-21	Río Samborombón	-35.710905	-57.358154	Otoño
TL15	13-6-21	Tapera de López	-36.321863	-56.77375	Otoño
GL15	13-6-21	General Lavalle	-36.398706	-56.946798	Otoño
CG15	13-6-21	Cerro de la Gloria	-35.971921	-57.446353	Otoño
RS15	13-6-21	Río Samborombón	-35.710905	-57.358154	Otoño
TL16	18-7-21	Tapera de López	-36.321863	-56.77375	Invierno
GL16	18-7-21	General Lavalle	-36.398706	-56.946798	Invierno
CG16	18-7-21	Cerro de la Gloria	-35.971921	-57.446353	Invierno
RS16	18-7-21	Río Samborombón	-35.710905	-57.358154	Invierno
TL17	29-8-21	Tapera de López	-36.321863	-56.77375	Invierno
GL17	29-8-21	General Lavalle	-36.398706	-56.946798	Invierno
CG17	29-8-21	Cerro de la Gloria	-35.971921	-57.446353	Invierno
RS17	29-8-21	Río Samborombón	-35.710905	-57.358154	Invierno

TL18	19-9-21	Tapera de López	-36.321863	-56.77375	Invierno
GL18	19-9-21	General Lavalle	-36.398706	-56.946798	Invierno
CG18	19-9-21	Cerro de la Gloria	-35.971921	-57.446353	Invierno
RS18	19-9-21	Río Samborombón	-35.710905	-57.358154	Invierno
TL19	30-10-21	Tapera de López	-36.321863	-56.77375	Primavera
GL19	30-10-21	General Lavalle	-36.398706	-56.946798	Primavera
CG19	30-10-21	Cerro de la Gloria	-35.971921	-57.446353	Primavera
RS19	30-10-21	Río Samborombón	-35.710905	-57.358154	Primavera
TL20	27-11-21	Tapera de López	-36.321863	-56.77375	Primavera
GL20	27-11-21	General Lavalle	-36.398706	-56.946798	Primavera
CG20	27-11-21	Cerro de la Gloria	-35.971921	-57.446353	Primavera
RS20	27-11-21	Río Samborombón	-35.710905	-57.358154	Primavera
TL21	19-12-21	Tapera de López	-36.321863	-56.77375	Primavera
GL21	19-12-21	General Lavalle	-36.398706	-56.946798	Primavera
RS21	19-12-21	Río Samborombón	-35.710905	-57.358154	Primavera

Anexo 3. Diversidad de organismos pertenecientes a diversos grupos taxonómicos observados bajo microscopía electrónica de barrido, obtenidos a partir de las muestras cualitativas provenientes de los muestreos realizados desde embarcación y desde la costa.

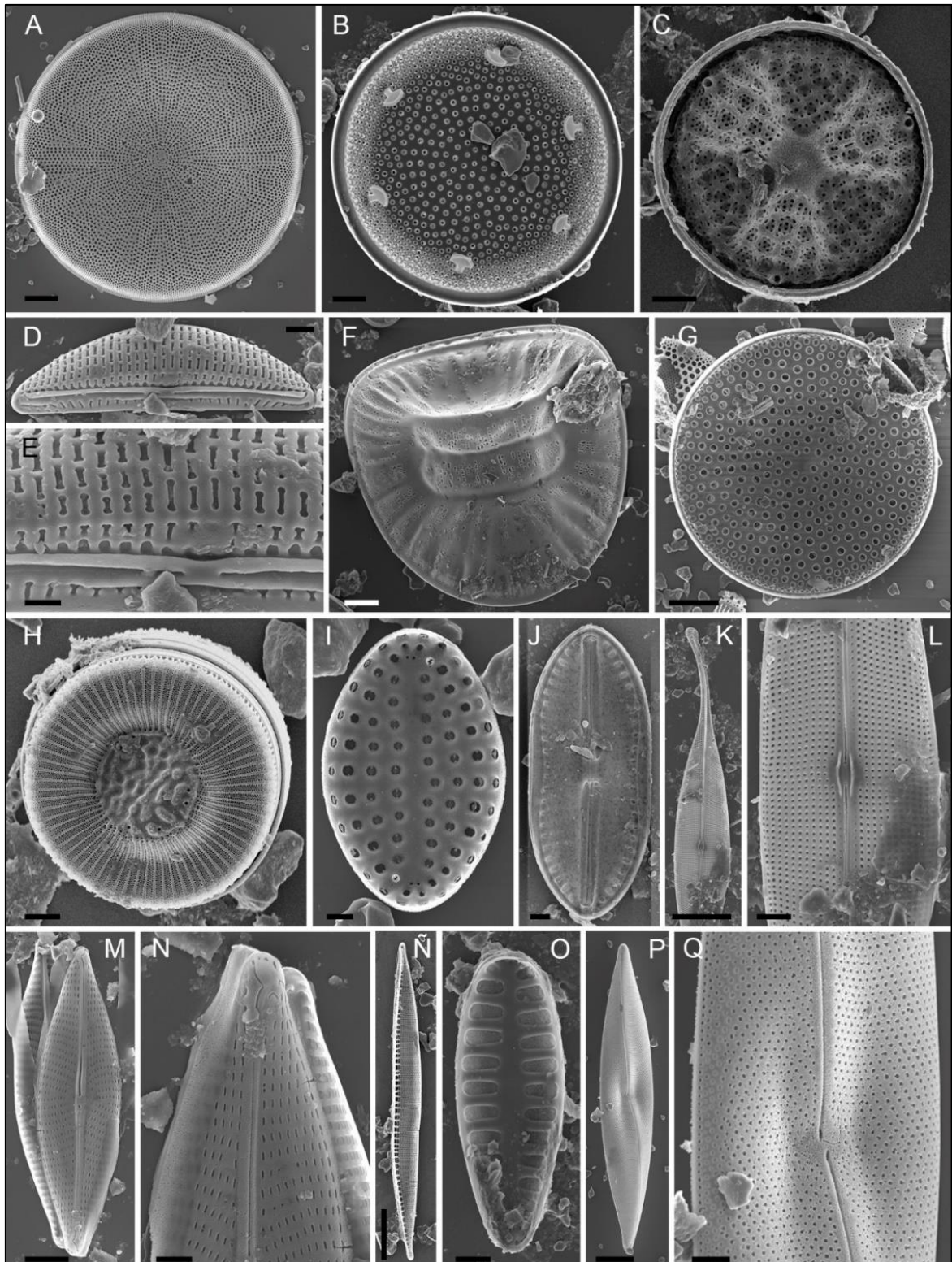


Fig. 9.1. Diversidad de diatomeas observadas en MEB. **A**, *Actinocyclus octonarius*. **B**, *Actinocyclus octonarius* var. *tenellus*. **C**, *Actinoptychus senarius*. **D-E**, *Amphora* sp. **F**, *Campylodiscus* sp. **G**, *Coscinodiscus radiatus*. **H**, *Cyclotella* sp. **I**, *Delphineis minutissima*. **J**, *Diploneis aestuarii*. **K-L**, *Gyrosigma fasciola*. **M-N**, *Navicula* sp. **Ñ**, *Nitzschia* sp. **O**, *Opephora* sp. **P-Q**, *Pleurosigma inflatum*. Escalas = 10 μm (A, F, G, K, Ñ, P), 4 μm (C), 3 μm (B, H), 2 μm (D, L, M, O, Q), 1 μm (E, I, J, N).

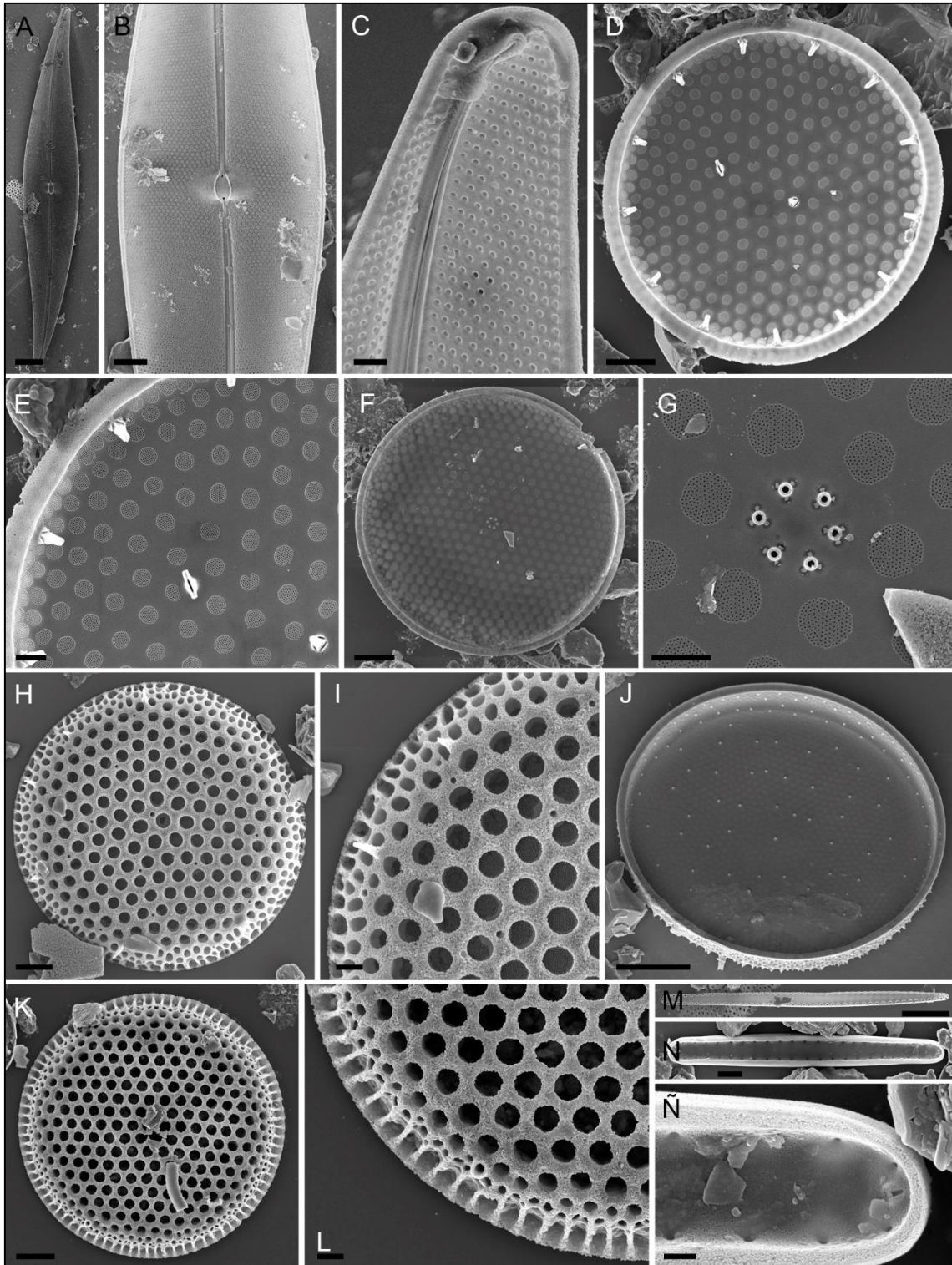


Fig. 9.2. Diversidad de diatomeas observadas en MEB. **A-C**, *Pleurosigma normanii*. **D-E**, *Shionodiscus oestrupii* var. *venrikae*. **F-G**, *Thalassiosira nodulolineata*. **H-J**, *Thalassiosira eccentrica*. **K-L**, *Thalassiosira simonsenii*. **M**, *Thalassionema* cf. *nitzschioides*. **N-Ñ**, *Thalassionema nitzschioides*. Escalas, = 10 μm (A, J, M), 5 μm (F), 4 μm (B, K), 3 μm (D, H), 2 μm (N), 1 μm (C, E, G, I, L), 400 nm (Ñ).

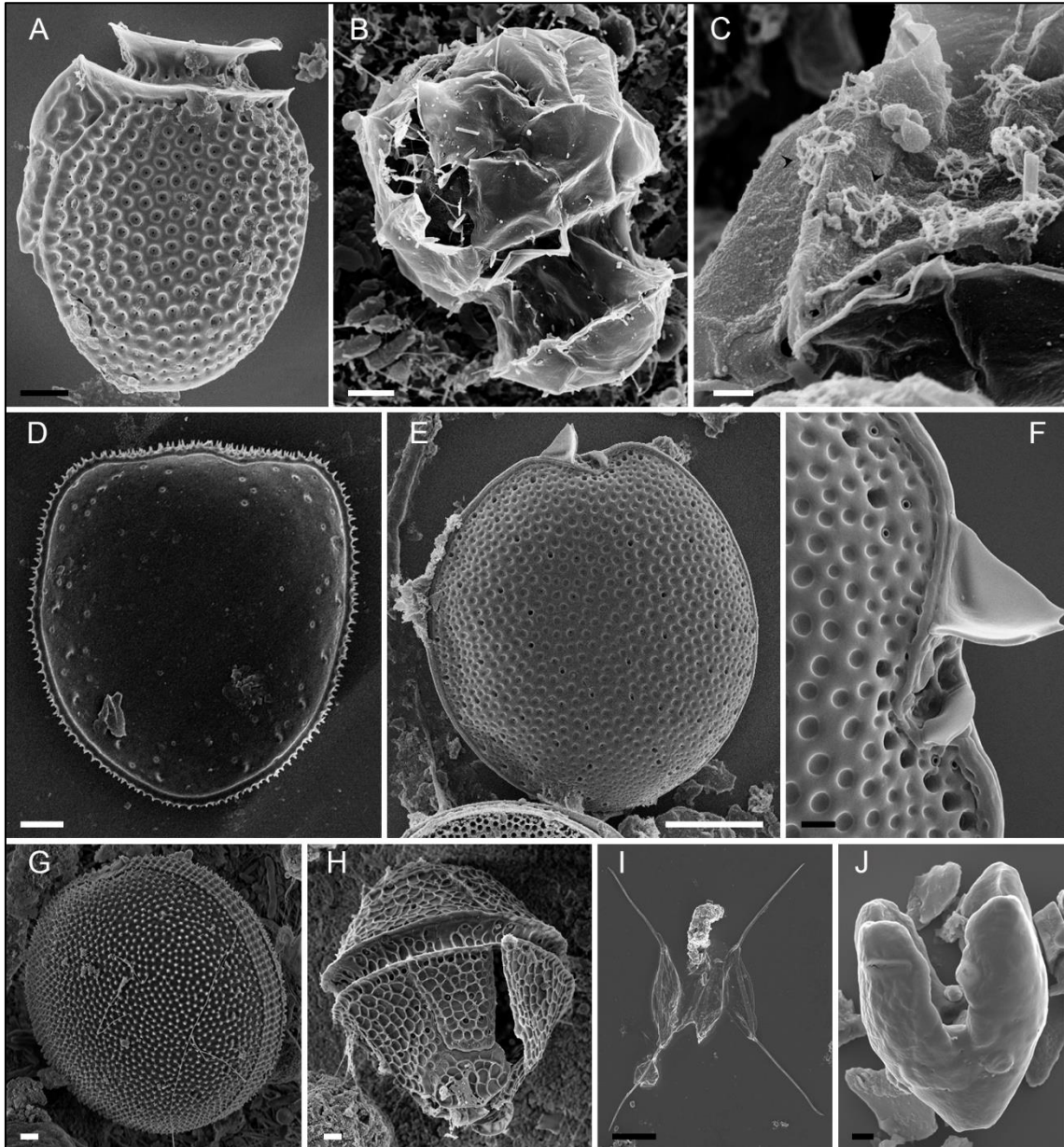


Fig. 9.3. Diversidad de dinoflagelados y ejemplar de clorofíceas y prasinofíceas observadas en MEB. **A**, *Dinophysis acuminata*. **B**, *Heterocapsa rotundata*. **C**, detalle de escamas (flechas negras) de *Heterocapsa rotundata*. **D**, *Prorocentrum cordatum*. **E**, *Prorocentrum texanum*. **F**, detalle apical *Prorocentrum texanum*. **G**, *Prorocentrum* sp. **H**, *Protoceratium* sp. **I**, *Desmodesmus* aff. *opoliensis*. **J**, *Pyramimonas* sp. Escalas = 10 μm (E, I), 5 μm (A), 2 μm (D), 1 μm (B, F, G, H, J), 200 nm (C).

Anexo 4. Lista de especies, países, códigos de cepa, números de acceso del GenBank y referencias utilizadas en la filogenia del complejo *Chattonella marina* a partir del LSU rADN. En negrita se encuentran las secuencias utilizadas en el Capítulo 4 obtenidas a partir de esta tesis. Referencias, Nd, no datos.

Especies	País	Cepa	Número de acceso	Referencias
<i>Chattonella antiqua</i>	Japón	CCMP2052	FJ030891	Riisberg <i>et al.</i> (2009)
<i>Chattonella malayana</i>	Malasia	CtBk01	LC721667	Lum <i>et al.</i> (2022)
<i>Chattonella malayana</i>	Malasia	CtBk02	LC721668	Lum <i>et al.</i> (2022)
<i>Chattonella malayana</i>	Malasia	CtBk03	LC721669	Lum <i>et al.</i> (2022)
<i>Chattonella marina</i>	Argentina	LPCc045	OR096705	Esta tesis
<i>Chattonella marina</i>	Argentina	LPCc046	OR088598	Esta tesis
<i>Chattonella marina</i>	Argentina	LPCc047	OR095727	Esta tesis
<i>Chattonella marina</i>	China	Nd	AY704162	Kai <i>et al.</i> (2006)
<i>Chattonella marina</i>	China	Tio862	LC721678	Lum <i>et al.</i> (2022)
<i>Chattonella marina</i>	China	TJC2_1	LC721679	Lum <i>et al.</i> (2022)
<i>Chattonella marina</i>	Japón	NIES848	AB286928	Kamikawa <i>et al.</i> (2007)
<i>Chattonella marina</i>	Malasia	ChMi01	LC633848	Lum <i>et al.</i> (2021)
<i>Chattonella marina</i>	Malasia	ChMi02	LC721676	Lum <i>et al.</i> (2022)
<i>Chattonella marina</i>	Malasia	ChMi03	LC721677	Lum <i>et al.</i> (2022)
<i>Chattonella marina</i>	Malasia	CtST01	LC721682	Lum <i>et al.</i> (2022)
<i>Chattonella marina</i>	Malasia	CtSb02	LC721683	Lum <i>et al.</i> (2022)
<i>Chattonella marina</i>	Malasia	CaBK02	LC721684	Lum <i>et al.</i> (2022)
<i>Chattonella marina</i>	Rusia	VL508	LC633841	Lum <i>et al.</i> (2021)
<i>Chattonella marina</i> var. <i>antiqua</i>	Brasil	CASC1	MH297980	Branco <i>et al.</i> (2019)
<i>Chattonella marina</i> var. <i>antiqua</i>	Japón	NIES1	AB217631	No publicado
<i>Chattonella marina</i> var. <i>antiqua</i>	Japón	NIES558	AB217632	No publicado
<i>Chattonella marina</i> var. <i>antiqua</i>	Japón	OA3	AB217633	No publicado
<i>Chattonella marina</i> var. <i>antiqua</i>	Japón	G8	AB217634	No publicado
<i>Chattonella marina</i> var. <i>antiqua</i>	Japón	NIES86	AB217868	No publicado
<i>Chattonella marina</i> var. <i>antiqua</i>	NZ	CAWR23	MW177907	No publicado
<i>Chattonella marina</i> var. <i>antiqua</i>	Japón	CCMP2049	JX067557	Klöpper <i>et al.</i> (2013)

<i>Chattonella marina</i> var. <i>ovata</i>	Japón	NIES603	AB217640	No publicado
<i>Chattonella marina</i> var. <i>ovata</i>	Japón	ovata-P	AB217641	No publicado
<i>Chattonella ovata</i>	Hong Kong	Nd	AY704163	Kai <i>et al.</i> (2006)
<i>Chattonella</i> sp.	Japón	CCMP218	JX067558	Klöpper <i>et al.</i> (2013)
<i>Chattonella subsalsa</i>	Brasil	Ca11	MH297976	Branco <i>et al.</i> (2019)
<i>Chattonella subsalsa</i>	Brasil	Ca14	MH297977	Branco <i>et al.</i> (2019)
<i>Chattonella subsalsa</i>	Brasil	Ca15	MH297978	Branco <i>et al.</i> (2019)
<i>Chattonella subsalsa</i>	Brasil	CSRJ1	MH297979	Branco <i>et al.</i> (2019)
<i>Chattonella subsalsa</i>	Irán	CHPI36	JF896100	Attaran-Fariman & Bolch (2014)
<i>Chattonella subsalsa</i>	Italia	CRIM_H	JX067561	Klöpper <i>et al.</i> (2013)
<i>Chattonella subsalsa</i>	Italia	CRIM_N	JX067573	Klöpper <i>et al.</i> (2013)
<i>Chattonella subsalsa</i>	EE. UU.	CCMP217	AF210736	Tyrrell <i>et al.</i> (2001)
<i>Chattonella subsalsa</i>	EE. UU.	CCMP2793	EU165295	Scorzetti <i>et al.</i> (2009)
<i>Chattonella subsalsa</i>	EE. UU.	CS0707-1	KP702884	Engesmo <i>et al.</i> (2016)
<i>Chattonella tenuiplastida</i>	Malasia	CtaLuT01	LC721670	Lum <i>et al.</i> (2022)
<i>Chattonella tenuiplastida</i>	Malasia	St1409S2	LC721671	Lum <i>et al.</i> (2022)
<i>Chattonella tenuiplastida</i>	Malasia	LChTD267F 2	LC721672	Lum <i>et al.</i> (2022)
<i>Chattonella tenuiplastida</i>	Tailandia	GBTH104	LC721673	Lum <i>et al.</i> (2022)
<i>Chattonella tenuiplastida</i>	Tailandia	THK338	LC721674	Lum <i>et al.</i> (2022)
<i>Chattonella tenuiplastida</i>	Tailandia	THK339	LC721675	Lum <i>et al.</i> (2022)
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Australia	CCMP1661	JX067580	Klöpper <i>et al.</i> (2013)
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Brasil	FJSC3	MH297983	Branco <i>et al.</i> (2019)
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Alemania	Fibjap_JG	JX067579	Klöpper <i>et al.</i> (2013)
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Italy	FRIM_E	JX067576	Klöpper <i>et al.</i> (2013)
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Japón	LB 2162	AF086949	No publicado
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Australia	CAWR04	KP702890	Engesmo <i>et al.</i> (2016)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Brasil	Ha1	MH297981	Branco <i>et al.</i> (2019)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Canada	UBC-B	DQ470659	Ki & Han. (2007)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Chile	HA_CREAN	OL764492	Flores-Leñero <i>et al.</i> (2022)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Japón	NIES 293	DQ470658	Ki & Han (2007)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Korea	HAKS-01	DQ470660	Ki & Han (2007)

<i>Heterosigma akashiwo</i>	NZ	CAWR13	KP702895	Engesmo <i>et al.</i> (2016)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	EE. UU.	CCMP2274	JX067555	Klöpper <i>et al.</i> (2013)
<i>Heterosigma minor</i>	EE. UU.	HA0504-1	KP780268	Engesmo <i>et al.</i> (2016)
<i>Vacuolaria virescens</i>	Nd	Nd	AF409125	Ben Ali <i>et al.</i> (2002)

Anexo 5. Lista de especies, países, códigos de cepa, números de acceso del GenBank y referencias utilizadas en la filogenia de *Fibrocapsa japonica* a partir del LSU rADN. En negrita se encuentran las secuencias utilizadas en el Capítulo 5 obtenidas a partir de esta tesis. Referencias, Nd, no datos.

Especies	País	Cepa	Número de acceso	Referencias
<i>Chattonella antiqua</i>	Japón	CCMP2052	FJ030891	Riisberg <i>et al.</i> (2009)
<i>Chattonella malayana</i>	Malasia	CtBk01	LC721667	Lum <i>et al.</i> (2022)
<i>Chattonella malayana</i>	Malasia	CtBk02	LC721668	Lum <i>et al.</i> (2022)
<i>Chattonella malayana</i>	Malasia	CtBk03	LC721669	Lum <i>et al.</i> (2022)
<i>Chattonella marina</i>	Argentina	LPCc045	OR096705	Esta tesis
<i>Chattonella marina</i>	Argentina	LPCc046	OR088598	Esta tesis
<i>Chattonella marina</i>	Argentina	LPCc047	OR095727	Esta tesis
<i>Chattonella marina</i>	Rusia	VL508	LC633841	Lum <i>et al.</i> (2021)
<i>Chattonella marina</i> var. <i>antiqua</i>	Brasil	CASC1	MH297980	Branco <i>et al.</i> (2019)
<i>Chattonella marina</i> var. <i>antiqua</i>	Japón	NIES1	AB217631	No publicado
<i>Chattonella marina</i> var. <i>antiqua</i>	Japón	NIES86	AB217868	No publicado
<i>Chattonella marina</i> var. <i>antiqua</i>	NZ	CAWR23	MW177907	No publicado
<i>Chattonella marina</i> var. <i>ovata</i>	Japón	NIES603	AB217640	No publicado
<i>Chattonella ovata</i>	Hong Kong	Nd	AY704163	Kai <i>et al.</i> (2006)
<i>Chattonella subsalsa</i>	Brasil	Ca11	MH297976	Branco <i>et al.</i> (2019)
<i>Chattonella subsalsa</i>	Brasil	CSRJ1	MH297979	Branco <i>et al.</i> (2019)
<i>Chattonella subsalsa</i>	Irán	CHPI36	JF896100	Attaran-Fariman & Bolch (2014)
<i>Chattonella subsalsa</i>	Italia	CRIM_H	JX067561	Klöpper <i>et al.</i> (2013)
<i>Chattonella subsalsa</i>	EE. UU.	CS0707-1	KP702884	Engesmo <i>et al.</i> (2016)
<i>Chattonella tenuiplastida</i>	Malasia	CtaLuT01	LC721670	Lum <i>et al.</i> (2022)
<i>Chattonella tenuiplastida</i>	Malasia	St1409S2	LC721671	Lum <i>et al.</i> (2022)
<i>Chattonella tenuiplastida</i>	Malasia	LChTD267F2	LC721672	Lum <i>et al.</i> (2022)
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Argentina	LPCc058	OR514481	Esta tesis
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Argentina	LPCc048	OR498773	Esta tesis
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Argentina	LPCc049	OR498774	Esta tesis

<i>Fibrocapsa japonica</i>	Argentina	LPcC050	OR498775	Esta tesis
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Argentina	LPcC051	OR498776	Esta tesis
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Alemania	Fibjap_JG	JX067579	Klöpper <i>et al.</i> (2013)
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Alemania	SCCAP K-0542	KU314865	No publicado
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Australia	CCMP1661	JX067580	Klöpper <i>et al.</i> (2013)
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Brasil	FJSC3	MH297983	Branco <i>et al.</i> (2019)
<i>Fibrocapsa japonica</i>	EE. UU.	NCCW-ARC10	MW774062	No publicado
<i>Fibrocapsa japonica</i>	EE. UU.	UNCW-ARC11	MW774063	No publicado
<i>Fibrocapsa japonica</i>	EE. UU.	UNCW-ARC12	MW774064	No publicado
<i>Fibrocapsa japonica</i>	EE. UU.	UNCW-ARC13	MW774065	No publicado
<i>Fibrocapsa japonica</i>	EE. UU.	UNCW-ARC15	MW774066	No publicado
<i>Fibrocapsa japonica</i>	EE. UU.	UNCW-ARC16	MW774067	No publicado
<i>Fibrocapsa japonica</i>	EE. UU.	UNCW-ARC17	MW774068	No publicado
<i>Fibrocapsa japonica</i>	EE. UU.	UNCW-ARC40	MW774082	No publicado
<i>Fibrocapsa japonica</i>	EE. UU.	UNCW-ARC53	MW774086	No publicado
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Italia	FRIM_C	JX067574	Klöpper <i>et al.</i> (2013)
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Italia	FRIM_D	JX067575	Klöpper <i>et al.</i> (2013)
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Italia	FRIM_E	JX067576	Klöpper <i>et al.</i> (2013)
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Italia	FRIM_A	JX067577	Klöpper <i>et al.</i> (2013)
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Italia	FRIM_B	JX067578	Klöpper <i>et al.</i> (2013)
<i>Fibrocapsa japonica</i>		CAWR03	AF210740	Tyrrell <i>et al.</i> (2001)
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Japón	LB 2162	AF086949	No publicado
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Argentina	LPcC052	OR494634	Esta tesis
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Argentina	LPcC053	OR494633	Esta tesis
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Argentina	LPcC054	OR494680	Esta tesis
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Argentina	LPcC055	OR494681	Esta tesis
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Argentina	LPcC056	OR494693	Esta tesis
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Argentina	LPcC057	OR514480	Esta tesis
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Argentina	LPcC031	OR514479	Esta tesis
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Argentina	LPcC042	PP799058	Esta tesis
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Australia	CAWR04	KP702890	Engesmo <i>et al.</i> (2016)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Brasil	Ha1	MH297981	Branco <i>et al.</i> (2019)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Canadá	UBC-B	DQ470659	Ki & Han. (2007)

<i>Heterosigma akashiwo</i>	Chile	HA_CREAN	OL764492	Flores-Leñero <i>et al.</i> (2022)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	EE. UU.	CCMP2274	JX067555	Klöpper <i>et al.</i> (2013)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Korea	HAKS-01	DQ470660	Ki & Han (2007)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	NZ	CAWR13	KP702895	Engesmo <i>et al.</i> (2016)
<i>Heterosigma minor</i>	EE. UU.	HA0504-1	KP780268	Engesmo <i>et al.</i> (2016)
<i>Vacuolaria virescens</i>	Nd	Nd	AF409125	Ben Ali <i>et al.</i> (2002)

Anexo 6. Lista de especies, países, códigos de cepa, números de acceso del GenBank y referencias utilizadas en la filogenia de *Heterosigma akashiwo* a partir del LSU rADN. En negrita se encuentran las secuencias utilizadas en el Capítulo 6 obtenidas a partir de esta tesis. Referencias, Nd, no datos.

Especies	País	Cepa	Número de acceso	Referencias
<i>Chattonella antiqua</i>	Japón	CCMP2052	FJ030891	Riisberg <i>et al.</i> (2009)
<i>Chattonella malayana</i>	Malasia	CtBk01	LC721667	Lum <i>et al.</i> (2022)
<i>Chattonella malayana</i>	Malasia	CtBk02	LC721668	Lum <i>et al.</i> (2022)
<i>Chattonella malayana</i>	Malasia	CtBk03	LC721669	Lum <i>et al.</i> (2022)
<i>Chattonella marina</i>	Argentina	LPCc045	OR096705	Esta tesis
<i>Chattonella marina</i>	Argentina	LPCc046	OR088598	Esta tesis
<i>Chattonella marina</i>	Argentina	LPCc047	OR095727	Esta tesis
<i>Chattonella marina</i>	Malasia	ChMi01	LC633848	Lum <i>et al.</i> (2021)
<i>Chattonella marina</i>	Rusia	VL508	LC633841	Lum <i>et al.</i> (2021)
<i>Chattonella marina</i> var. <i>antiqua</i>	Brasil	CASC1	MH297980	Branco <i>et al.</i> (2019)
<i>Chattonella marina</i> var. <i>antiqua</i>	Japón	NIES1	AB217631	No publicado
<i>Chattonella marina</i> var. <i>antiqua</i>	Japón	NIES86	AB217868	No publicado
<i>Chattonella marina</i> var. <i>antiqua</i>	NZ	CAWR23	MW177907	No publicado
<i>Chattonella marina</i> var. <i>ovata</i>	Japón	NIES603	AB217640	No publicado
<i>Chattonella ovata</i>	Hong Kong	Nd	AY704163	Kai <i>et al.</i> (2006)
<i>Chattonella subsalsa</i>	Brasil	Ca11	MH297976	Branco <i>et al.</i> (2019)
<i>Chattonella subsalsa</i>	Brasil	CSRJ1	MH297979	Branco <i>et al.</i> (2019)
<i>Chattonella subsalsa</i>	Irán	CHPI36	JF896100	Attaran-Fariman & Bolch (2014)
<i>Chattonella subsalsa</i>	Italia	CRIM_H	JX067561	Klöpper <i>et al.</i> (2013)
<i>Chattonella subsalsa</i>	EE. UU.	CS0707-1	KP702884	Engesmo <i>et al.</i> (2016)
<i>Chattonella tenuiplastida</i>	Malasia	CtaLuT01	LC721670	Lum <i>et al.</i> (2022)
<i>Chattonella tenuiplastida</i>	Malasia	St1409S2	LC721671	Lum <i>et al.</i> (2022)
<i>Chattonella tenuiplastida</i>	Malasia	LChTD267F2	LC721672	Lum <i>et al.</i> (2022)
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Argentina	LPCc058	OR514481	Esta tesis
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Argentina	LPCc048	OR498773	Esta tesis

<i>Fibrocapsa japonica</i>	Argentina	LPCc049	OR498774	Esta tesis
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Argentina	LPCc050	OR498775	Esta tesis
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Argentina	LPCc051	OR498776	Esta tesis
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Alemania	Fibjap_JG	JX067579	Klöpper <i>et al.</i> (2013)
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Alemania	SCCAP K-0542	KU314865	No publicado
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Australia	CCMP1661	JX067580	Klöpper <i>et al.</i> (2013)
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Brasil	FJSC3	MH297983	Branco <i>et al.</i> (2019)
<i>Fibrocapsa japonica</i>	EE. UU.	UNCW-ARC15	MW774066	No publicado
<i>Fibrocapsa japonica</i>	EE. UU.	UNCW-ARC16	MW774067	No publicado
<i>Fibrocapsa japonica</i>	EE. UU.	UNCW-ARC17	MW774068	No publicado
<i>Fibrocapsa japonica</i>	EE. UU.	UNCW-ARC40	MW774082	No publicado
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Italia	FRIM_E	JX067576	Klöpper <i>et al.</i> (2013)
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Italia	FRIM_A	JX067577	Klöpper <i>et al.</i> (2013)
<i>Fibrocapsa japonica</i>		CAWR03	AF210740	Tyrrell <i>et al.</i> (2001)
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Japón	LB 2162	AF086949	No publicado
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Argentina	LPCc052	OR494634	Esta tesis
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Argentina	LPCc053	OR494633	Esta tesis
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Argentina	LPCc054	OR494680	Esta tesis
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Argentina	LPCc055	OR494681	Esta tesis
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Argentina	LPCc056	OR494693	Esta tesis
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Argentina	LPCc057	OR514480	Esta tesis
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Argentina	LPCc031	OR514479	Esta tesis
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Argentina	LPCc042	PP799058	Esta tesis
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Australia	CAWR04	KP702890	Engesmo <i>et al.</i> (2016)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Brasil	Ha1	MH297981	Branco <i>et al.</i> (2019)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Brasil	HASC2	MH297982	Branco <i>et al.</i> (2019)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Canadá	UBC-B	DQ470659	Ki & Han. (2007)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Chile	HA_CREAN	OL764492	Flores-Leñero <i>et al.</i> (2022)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	China	Nd	AY704161	No publicado
<i>Heterosigma akashiwo</i>	EE. UU.	CCMP2274	JX067555	Klöpper <i>et al.</i> (2013)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	EE. UU.	HA0605-1	KP702888	Engesmo <i>et al.</i> (2016)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	EE. UU.	CCMP2817	EU165291	Scorzetti <i>et al.</i> (2009)

<i>Heterosigma akashiwo</i>	Dinamarca	K-1549	KP702897	Engesmo <i>et al.</i> (2016)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Dinamarca	K-1553	KP702901	Engesmo <i>et al.</i> (2016)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Dinamarca	K-1550	KP702898	Engesmo <i>et al.</i> (2016)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Japón	HA0210-1	KP702886	Engesmo <i>et al.</i> (2016)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Japón	NIES-145	AB217645	No publicado
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Japón	NIES 293	DQ470658	Ki & Han (2007)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Japón	NIES-5	AB217644	No publicado
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Korea	HAKS-01	DQ470660	Ki & Han (2007)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Korea	NFHTS-AK-1	DQ470661	Ki & Han (2007)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Korea	Nd	AF042820	No publicado
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Korea	HYM06HA	DQ470662	Ki & Han (2007)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	NZ	CAWR13	KP702895	Engesmo <i>et al.</i> (2016)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	NZ	HA0605-2	KP702889	Engesmo <i>et al.</i> (2016)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	NZ	CAWR05	KP702891	Engesmo <i>et al.</i> (2016)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	NZ	CAWR06	KP702892	Engesmo <i>et al.</i> (2016)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	NZ	CAWR08	KP702893	Engesmo <i>et al.</i> (2016)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	NZ	CAWR09	KP702894	Engesmo <i>et al.</i> (2016)
<i>Heterosigma minor</i>	EE. UU.	HA0504-1	KP780268	Engesmo <i>et al.</i> (2016)
<i>Vacuolaria virescens</i>	Nd	Nd	AF409125	Ben Ali <i>et al.</i> (2002)

Anexo 7. Lista de especies, países, códigos de cepa, números de acceso del GenBank y referencias utilizadas en la filogenia de *Gymnodinium catenatum* y *G. impudicum* a partir del LSU rADN. En negrita se encuentran las secuencias utilizadas en el Capítulo 7 obtenidas a partir de esta tesis. Referencias, Nd, no datos.

Especies	País	Cepa	Número de acceso	Referencias
<i>Barrufeta bravensis</i>	España	VGO863	FN647672	Sampedro <i>et al.</i> (2011)
<i>Barrufeta bravensis</i>	España	VGO864	FN647673	Sampedro <i>et al.</i> (2011)
<i>Barrufeta bravensis</i>	España	VGO859	FN647674	Sampedro <i>et al.</i> (2011)
<i>Barrufeta bravensis</i>	España	VGO862	FN647675	Sampedro <i>et al.</i> (2011)
<i>Barrufeta resplendens</i>	EE. UU.	GM16	KT203381	Gu <i>et al.</i> (2015)
<i>Barrufeta resplendens</i>	EE. UU.	GM17	KT203382	Gu <i>et al.</i> (2015)
<i>Gymnodinium catenatum</i>	Argentina	LPCc043	OP850345	Esta tesis
<i>Gymnodinium catenatum</i>	Australia	GCCC21	AY036072	Holmes <i>et al.</i> (2002)
<i>Gymnodinium catenatum</i>	China	GCHK53	AY036123	Holmes <i>et al.</i> (2002)
<i>Gymnodinium catenatum</i>	China	GCDL01	KF234065	Luo <i>et al.</i> (2018)
<i>Gymnodinium catenatum</i>	China	GCQD01	KF234066	Luo <i>et al.</i> (2018)
<i>Gymnodinium catenatum</i>	Corea del Sur	GCCW991	AY036125	Holmes <i>et al.</i> (2002)
<i>Gymnodinium catenatum</i>	Corea del Sur	DC99A44	AY036127	Holmes <i>et al.</i> (2002)
<i>Gymnodinium catenatum</i>	España	Nd	AF200672	Hansen <i>et al.</i> (2000)
<i>Gymnodinium catenatum</i>	España	CCMP414	DQ779990	No publicado
<i>Gymnodinium catenatum</i>	España	GC19V	AF375856	No publicado
<i>Gymnodinium catenatum</i>	España	GC36AM	AF375857	No publicado
<i>Gymnodinium catenatum</i>	España	GC12V	AF375855	No publicado
<i>Gymnodinium catenatum</i>	Nueva Zelanda	CAWD101	AY036128	Holmes <i>et al.</i> (2002)
<i>Gymnodinium catenatum</i>	Singapur	GCSG2	AY036121	Holmes <i>et al.</i> (2002)
<i>Gymnodinium catenatum</i>	Uruguay	GCUR43	AY036124	Holmes <i>et al.</i> (2002)
<i>Gymnodinium fuscum</i>	Dinamarca	CCMP1677	AF200676	Daugbjerg <i>et al.</i> (2000)
<i>Gymnodinium dorsalisulcum</i>	Australia	SM28	DQ336190	Kang <i>et al.</i> (2013)
<i>Gymnodinium dorsalisulcum</i>	Australia	KDAAD	DQ837533	Kang <i>et al.</i> (2013)
<i>Gymnodinium dorsalisulcum</i>	China	TIO09	MH732682	Luo <i>et al.</i> (2018)
<i>Gymnodinium dorsalisulcum</i>	Malasia	SS10H1	MH732684	Luo <i>et al.</i> (2018)

<i>Gymnodinium impudicum</i>	Argentina	LPCc044	OP851763	Esta tesis
<i>Gymnodinium impudicum</i>	China	TIO335	MH732685	Luo <i>et al.</i> (2018)
<i>Gymnodinium impudicum</i>	España	Gy2VA	JN400079	Reñé <i>et al.</i> (2011)
<i>Gymnodinium impudicum</i>	España	ICMB204	KP790184	Reñé <i>et al.</i> (2015)
<i>Gymnodinium impudicum</i>	Francia	IFR1020	KJ508393	Nezan <i>et al.</i> (2014)
<i>Gymnodinium impudicum</i>	Francia	TIO251	MH732686	Luo <i>et al.</i> (2018)
<i>Gymnodinium impudicum</i>	Italia	JL30	AF200674	Reñé <i>et al.</i> (2011)
<i>Gymnodinium impudicum</i>	Korea	GrIp02	DQ779993	Ki & Han (2007b)
<i>Gymnodinium impudicum</i>	México	GIBACO-1	MT070782	Band-Schmidt <i>et al.</i> (2020)
<i>Gymnodinium litoralis</i>	España	ICMB224	JN400080	Reñé <i>et al.</i> (2011)
<i>Gymnodinium litoralis</i>	España	VGO859	FN647674	No publicado
<i>Gymnodinium litoralis</i>	Italia	UNISS1	JN400084	Reñé <i>et al.</i> (2011)
<i>Gymnodinium microreticulatum</i>	Australia	GMNC01	AY036078	Sampedro <i>et al.</i> (2011)
<i>Gymnodinium microreticulatum</i>	Uruguay	GMUR02	AY916539	Patil <i>et al.</i> (2005)
<i>Gymnodinium nolleri</i>	Dinamarca	DK4	AF200673	Ellegard & Oshima (1998)
<i>Gymnodinium nolleri</i>	España	VGO663	FN649408	Sampedro <i>et al.</i> (2011)
<i>Gymnodinium nolleri</i>	España	VGO922	FN649409	Sampedro <i>et al.</i> (2011)
<i>Gymnodinium plasticum</i>	Canadá	TIO826	KY688184	Wang <i>et al.</i> (2017)
<i>Gymnodinium smaydae</i>	Korea	GSSW10	HG005135	Kang <i>et al.</i> (2013)
<i>Gymnodinium trapeziforme</i>	Francia	GYPC02	EF192414	Attaran Fariman <i>et al.</i> (2007), Kang <i>et al.</i> (2013)
<i>Lepidodinium chlorophorum</i>	Francia	IFR-LCH-01L	KJ508396	Nezan <i>et al.</i> (2014)
<i>Lepidodinium chlorophorum</i>	Sudáfrica	K-0539	AF200669	Hansen <i>et al.</i> (2000)
<i>Lepidodinium viride</i>	Sudáfrica	NA	DQ499645	No publicado
<i>Lepidodinium viride</i>	Sudáfrica	NA	AY464689	No publicado
<i>Wangodinium sinense</i>	China	GLY03	MH732679	Luo <i>et al.</i> (2018)
<i>Wangodinium sinense</i>	China	G27	MH732680	Luo <i>et al.</i> (2018)
<i>Wangodinium sinense</i>	China	GBH03	MH732681	Luo <i>et al.</i> (2018)
<i>Wangodinium sinense</i>	Korea del Sur	WsLomme01	OL699923	No publicado

Anexo 8. Lista de especies y géneros identificados en esta tesis, actualizado según la nomenclatura vigente en AlgaeBase (www.algaebase.org; Guiry & Guiry, 2024). No se incluyen los pequeños flagelados no identificados (fitoflagelados), cocales indeterminados, ni los taxa que no han sido identificados a nivel genérico.

Diatomeas

Actinocyclus octonarius Ehrenberg
Actinocyclus octonarius var. *tenellus* (Brébisson) Hendey
Actinocyclus spp. Ehrenberg
Actinoptychus senarius (Ehrenberg) Ehrenberg
Amphora sp. Eherenberg ex Kützing
Asterionellopsis glacialis (Castracane) Round
Aulacoseira cf. *granulata* (Ehrenberg) Simonsen
Bacillaria paxillifera (O.F.Müller) T.Marson
Caloneis cf. *westii* (W.Smith) Hendey
Caloneis sp. Cleve
Campylodiscus sp. Ehrenberg ex Kützing
Cerataulina pelagica (Cleve) Hendey
Ceratoneis sp. Ehrenberg
Chaetoceros decipiens Cleve
Chaetoceros lorenzianus Grunow
Chaetoceros socialis H.S.Lauder
Chaetoceros subtilis var. *abnormis* Proschkina-Lavrenko
Chaetoceros spp. Ehrenberg
Cocconeis cf. *placentula* Ehrenberg
Cocconeis cf. *scutellum* Ehrenberg
Coscinodiscus asteromphalus Ehrenberg
Coscinodiscus granii L.F.Gough
Coscinodiscus perforatus Ehrenberg
Coscinodiscus radiatus Ehrenberg
Coscinodiscus wailessi Gran & Angst
Coscinodiscopsis commutata (Grunow) E.A.Sar & I.Sunesen
Coscinodiscopsis sp. E.A.Sar & I.Sunesen
Cyclotella cubiculata E.A.Sar, I.Sunesen & A.S.Lavigne
Cyclotella litoralis Lange & Syvertsen
Cyclotella sp. (Kützing) Brébisson
Cylindrotheca closterium (Ehrenberg) Reimann & J.C.Lewin
Cymbella sp. C.Agardh
Cymatosira sp. Grunow
Dactyliosolen fragilissimus (Bergon) Hasle
Delphineis minutissima (Hustedt) Simonsen
Delphineis surirella (Ehrenberg) G.W.Andrews

Delphineis sp. G.W.Andrews
Detonula pumila (Castracane) Gran
Detonula sp. F.Schütt ex De Toni
Diploneis aestuarii Hustedt
Diploneis papula (A.W.F.Schmidt) Cleve
Ditylum brightwelli (T.West) Grunow
Entomoneis sp. Ehrenberg
Fragilariopsis aff. *oceanica* (Cleve) Hasle
Gomphonema sp. Ehrenberg
Guinardia delicatula (Cleve) Hasle
Guinardia flaccida (Castracane) H.Peragallo
Gyrosigma balticum (Ehrenberg) Rabenhorst
Gyrosigma fasciola (Ehrenberg) J.W.Griffith & Henfrey
Gyrosigma sp. Hassall
Haslea nipkowii (Meister) M.Poulin & G.Massé
Haslea sp. Simonsen
Hobaniella longicuris (Greville) P.A.Sims & D.M.Williams
Leptocylindrus danicus Cleve
Leptocylindrus minimun Gran
Lithodesmium cf. *undulatum* Ehrenberg
Melosira inflexa (Roth) Guiry
Melosira sp. C.Agardh
Navicula peregrina (Ehrenberg) Kützing
Navicula sp. Bory
Neobrightwellia alternans (Bailey) M.P.Ashworth & P.A.Sims
Nitzschia acicularis (Kützing) W.Smith
Nitzschia hummii Hustedt
Nitzschia longissima (Brábisson ex Kützing) Grunow
Nitzschia sigmaformis Hustedt
Nitzschia sp. Hassall
Odontella aurita (Lyngbye) C. Agardh
Odontella rostrata (Hustedt) Simonsen
Opephora sp. P.Petit
Paralia sp. Heiberg
Petrodictyon sp. D.G.Mann
Phaeodactylum tricornutum Bohlin
Plagiotropis sp. Pfitzer
Pleurosigma decorum W.Smith
Pleurosigma frenguellianum Sunesen, Sterrenburg & Sar
Pleurosigma hinzianum Sterrenburg, Sunesen & Sar
Pleurosigma inflatum Shadbolt
Pleurosigma normanii Ralfs
Pleurosigma spp. W.Smith
Pseudosolenia calcar-avis (Schultze) B.G.Sundström

Pseudosolenia sp. B.G.Sundström
Pseudo-nitzschia multiseriata (Hasle) Hasle
Pseudo-nitzschia pungens (Grunow ex Cleve) Hasle
Pseudo-nitzschia spp. H.Peragallo
Plagiotropis sp. Pfitzer
Raphoneis amphiceros (Ehrenberg) Ehrenberg
Rhizosolenia imbricata Brightwell
Rhizosolenia setigera f. *pungens* (A.Cleve) Brunel
Rhopalodia sp. O.Müller
Shionodiscus oestrupii var. *venrickae* (G.A.Fryxell & Hasle) A.J.Alverson, S.-H.Kang & E.C.Theriot
Skeletonema costatum (Greville) Cleve
Skeletonema tropicum Cleve
Skeletonema sp. Greville
Stephanocyclus meneghinianus (Kützing) Kulikovskiy, Genkal & Kociolek
Surirella aff. *ovalis* Brébisson
Surirella spp. Turpin
Tabularia spp. (Kützing) D.M.Williams & Round
Tenuicylindrus belgicae (Meunier) D.Nanjappa & A.Zingone
Thalassionema nitzschioides (Grunow) Mereschkowsky
Thalassionema sp. Grunow ex Mereschkowsky
Thalassiosira eccentrica (Ehrenberg) Cleve
Thalassiosira gravida Cleve
Thalassiosira lundiana Fryxell
Thalassiosira cf. *minima* Gaarder
Thalassiosira nodulolineata (Hendey) Hasle & G.A.Fryxell
Thalassiosira normanhendeyi D.M.Williams
Thalassiosira cf. *punctigera* (Grunow) Fryxell, Simonsen & Hasle
Thalassiosira simonsenii Hasle & G.Fryxell
Thalassiosira tenera Proshkina-Lavrenko
Thalassiosira sp. Cleve
Trieres chinensis (Greville) Ashworth & E.C.Theriot
Trieres mobiliensis (Bailey) Ashworth & E.C.Theriot
Zygoceros atlantica Ehrenberg

Cyanobacterias

Anabaena spp. Bory ex Bornet & Flahault
Aphanizomenon aff. *flos-aquae* Ralfs ex Bornet & Flahault
Aphanizomenon sp. Morren ex Bornet & Flahault
Aphanocapsa aff. *delicatissima* West & G.S.West
Aphanocapsa sp. Nägeli
Chroococcus minutus (Kützing) Nägeli
Chroococcus sp. Nägeli
Dolichospermum spiroides (Klebahn) Wacklin, L.Hoffmann & Komárek

Dolichospermum sp. (Ralfs ex Bornet & Flahault) P.Wacklin, L.Hoffmann & J.Komárek
Leptolyngbya sp. Anagnostidis & Komárek
Limnococcus limneticus (Lemmermann) Komárková, Jezberová, O.Komárek & Zapomelová
Lyngbya sp. C.Agardh ex Gomont
Merismopedia glauca (Ehrenberg) Kützing
Merismopedia tenuissima Lemmermann
Merismopedia sp. Meyen
Microcystis aeruginosa (Kützing) Kützing
Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner
Microcystis sp. Lemmermann
Nodularia spp. Mertens ex Bornet & Flahault
Oscillatoria spp. Vaucher ex Gomont
Phormidium sp. Kützing ex Gomont
Planktothrix sp. Anagnostidis & Komárek
Plectonema sp. Thuret ex Gomont
Johanseninema aff. *constrictum* (Szafer) Hasle, Dvorák & Poulícková
Pseudanabaena sp. Lauterborn
Raphidiopsis mediterranea Skuja
Raphidiopsis sp. F.E.Fritsch & M.F.Rich

Clorofíceas

Acutodesmus sp. (Hegewald) Tsarenko
Actinastrum hantzschii Lagerheim
Actinastrum fluviatile (J.L.B.Schröder) Fott
Actinastrum sp. Lagerheim
Ankistrodesmus aff. *gracilis* (Reinsch) Korshikov
Ankistrodesmus aff. *fusiformis* Corda
Ankistrodesmus spp. Corda
Binuclearia lauterbonii (Schmidle) Proshkina-Lavrenko
Chlamydomonas spp. Ehrenberg
Chodatella sp. Lemmermann
Coelastrum microporum Nägeli
Coelastrum spp. Nägeli
Closteriopsis longissima (Lemmermann) Lemmermann
Crucigenia quadrata Morren
Crucigenia sp. Morren
Desmodesmus abundans (Kirchner) E.H.Hegewald
Desmodesmus bicaudatus (Dedusenko) P.M.Tsarenko
Desmodesmus bicellularis (Chodat) S.S.An, T.Friedl & E.Hegewald
Desmodesmus communis (E.Hegewald) E.Hegewald
Desmodesmus aff. *cuneatus* (Skabichevskij) E.Hegewald
Desmodesmus intermedius (Chodat) E.Hegewald
Desmodesmus magnus (Meyen) P.M.Tsarenko

Desmodesmus microspina (Chodat) P.M.Tsarenko
Desmodesmus opoliensis (P.G.Richter) E.Hegewald
Desmodesmus aff. *protuberans* (F.E.Fritsch & M.F.Rich) E.Hegewald
Desmodesmus sp. (R.Chodat) S.S.An, T.Friedl & E.Hegewald
Dictyosphaerium cf. *pulchellum* H.C.Wood
Eudorina aff. *elegans* Ehrenberg
Golenkinia sp. Chodat
Kirchneriella irregularis (G.M.Smith) Korshikov
Kirchneriella sp. Schmidle
Lemmermannia komarekii (Hindák) C.Bock & Krienitz
Lemmermannia tetrapedia (Kirchner) Lemmermann
Monactinus simplex (Meyen) Corda
Monoraphidium arcuatum (Korshikov) Hindák
Monoraphidium irregulare (G.M.Smith) Komárková-Legnerová
Monoraphidium komarkovae Nygaard
Monoraphidium sp. Komárková-Legnerová
Oocystis parva West & G.S.West
Oocystis spp. Nägeli ex A.Braun
Pandorina morum (O.F.Müller) Bory
Pediastrum duplex Meyen
Pediastrum sp. Meyen
Planctonema sp. Schmidle
Pseudopediastrum sp. E.Hegewald
Pterosperma aff. *polygonum* Ostenfeld
Pterosperma sp. Pouchet
Raphidocelis danubiana (Hindák) Marvan, Komárek & Comas
Scenedesmus ellipticus Corda
Scenedesmus obtusus Meyen
Scenedesmus sp. Meyen
Schroederia setigera (Schröder) Lemmermann
Selenastrum sp. Reinsch
Tetradesmus lagerheimii M.J.Wynne & Guiry
Tetraedron aff. *trigonum* (Nägeli) Hansgirg
Willea rectangularis (A.Braun) D.M.John, M.J.Wynne & P.M.Tsarenko

Carofíceas

Cosmarium sp. Corda ex Ralfs
Saurastrum sp. Meyen ex Ralfs
Spirogyra sp. Link

Dictiocofíceas

Dictyocha fibula Ehrenberg
Dictyocha sp. Ehrenberg

Dinoflagelados

Ananella granifera H.J.Jeong, S.H.Jang, Moestrup & N.S.Kang
Akashiwo sanguinea (K.Hirasaka) Gert Hansen & Moestrup
Alexandrium sp. Halim
Dinophysis acuminata Claparède & Lachmann
Dinophysis caudata Kent
Dinophysis cf. *fortii* Pavillard
Diplosalis sp. R.S.Bergh
Gonyaulax sp. Diesing
Gymnodinium catenatum H.W.Graham
Gymnodinium impudicum (S.Fraga & I.Bravo) Gert Hansen & Moestrup
Gymnodinium sp. F.Stein
Gyrodinium sp. Kofoid & Swezy
Heterocapsa rotundata (Lohmann) Gert Hansen
Heterocapsa triquetra (Ehrenberg) F.Stein
Heterocapsa spp. F.Stein
Noctiluca scintillans (Macartney) Kofoid & Swezy
Oxyphysis oxitoides Kofoid
Polykrykos cf. *kofoidii* Chatton
Prorocentrum cordatum (Ostenfeld) J.D.Dodge
Prorocentrum micans Ehrenberg
Prorocentrum obtusum Ostenfeld
Prorocentrum texanum Henrichs, Steidinger, P.S.Scott & L.Campbell
Protoceratium sp. R.S.Bergh
Protoperidiinium cf. *brevipes* (Paulsen) Balech
Protoperidinium aff. *conicum* (Gran) Balech
Protoperidinium cf. *depressum* (Bailey) Balech
Protoperidinium cf. *divergens* (Ehrenberg) Balech
Protoperidinium obtusum (Karsten) Parke & J.D.Dodge
Protoperidinium pentagonum (Gran) Balech
Protoperidinium aff. *punctulatum* (Paulsen) Balech
Protoperidinium cf. *tristylum* (Stein) Balech
Protoperidinium sp. Bergh
Scrippsiella acuminata (Ehrenberg) Kretschmann, Elbrächter, Zinssmeister, S.Soehner, Kirsch, Kusber & Gottschling
Scrippsiella trochoidea (F.Stein) A.R.Loeblich
Scrippsiella sp. Balech
Tripos furca (Ehrenberg) F.Gómez
Tripos fusus (Ehrenberg) F.Gómez
Tripos cf. *muelleri* Bory

Euglenoideos

Euglena aff. *pusilla* Playfair
Euglena sanguinea Ehrenberg

Euglena sp. Ehrenberg

Euglenaria aff. *caudata* (E.F.W.Hübner) Karnkowska-Ishikawa & E.W.Linton

Lepocinclis fusiformis (H.J.Carter) Lemmermann

Lepocinclis sp. Perty

Phacus aff. *longicauda* (Ehrenberg) Dujardin

Phacus aff. *platalea* Dreżepolski

Phacus spp. Dukardin

Trachelomonas spp. Ehrenberg

Prasinofíceas

Pyramimonas longicauda L.Van Meel

Pyramimonas spp. Schmarda

Primnesiofíceas

Chrysochromulina sp. Lackey

Rafidofíceas

Chattonella marina (Subrahmanyam) Y.Hara & Chihara

Fibrocapsa japonica S.Toriumi & H.Takano

Heterosigma akashiwo (Hada) Hada ex Y.Hara & Chihara

Bibliografía

- Acha, E.M., Mianzan, H., Lasta, C.A. & Guerrero, R.A. 1999. Estuarine spawning of the whitemouth croaker *Micropogonias furnieri* (Pisces: Sciaenidae), in the Río de la Plata, Argentina. *Marine Freshwater Research* 50: 57–65. DOI: <https://doi.org/10.1071/MF98045>
- Acha, E.M., Mianzan, H., Guerrero, R., Carreto, J.I., Giberto, D., Montoya, N. & Carignan, M. 2008. An overview of physical and ecological processes in the Río de la Plata Estuary. *Continental Shelf Research* 28: 1579–1588. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.csr.2007.01.031>
- Acha, E.M., Piola, A., Iribarne, O. & Mianzan, H. 2015. Frontal Types. In: E.M. Acha, A. Piola, O. Iribarne & H. Mianzan (eds.). *Ecological Processes at Marine Fronts*, pp. 5–12. Springer Briefs in Environmental Science. Springer, Cham. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-15479-4_2
- Ahumada-Fierro, N.V., García-Mendoza, E., Sandoval-Gil, J.M. & Band-Schmidt, C.J. 2021. Photosynthesis and photoprotection characteristics related to ROS production in three *Chattonella* (Raphidophyceae) species. *Journal of Phycology* 57: 941–954. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpy.13138-20-232>
- Akselman, R., Carreto, J.I. & Montoya, N.G. 1998. *Gymnodinium catenatum* and autumn toxicity in northern shelf waters of Argentina. In: B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.). *Harmful Microalgae*, pp. 122–123. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography, IOC-UNESCO, St. Petersburg, EE. UU.
- Allen, D.M. & Barker, L.D. 1990. Interannual variations in larval fish recruitment to estuarine epibenthic habitats. *Marine Ecology Progress Series* 63: 113–125. DOI: <https://doi.org/10.3354/meps063113>
- Almandoz, G. O., Fabro, E., Ferrario, M., Tillmann, U., Cembella, A. & Krock, B. 2017. Species occurrence of the potentially toxigenic diatom genus *Pseudo-nitzschia* and the associated neurotoxin domoic acid in the Argentine Sea. *Harmful Algae* 63: 45–55. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.01.007>
- Alves, N.M., Braverman, M.S., Temperoni, B., Rodríguez, J.S. & Díaz, M.V. 2024.

-
- Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) are you ok? Reduction in nutritional condition of juveniles during winter in the Southwest Atlantic Ocean. *Fisheries Research* 272: 106949. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2024.106949>
- Amico, G.D., Luengo, M.S., Fucks, E. & Vilanova, I. 2022. Long-term shoreline evolution (Late-Holocene - 2018) of the Channel 15 coast (Samborombón bay, NE - Buenos Aires province, Argentina). *The Holocene* 32: 1121–1131. DOI: <https://doi.org/10.1177/09596836221114277>
- Anderson, D.M., Sullivan J.J. & Reguera B. 1989. Paralytic shellfish poisoning in Northwest Spain: the toxicity of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Toxicon* 27: 665-674. DOI: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(89\)90017-2](https://doi.org/10.1016/0041-0101(89)90017-2)
- Anderson, C. R., Moore, S. K., Tomlinson, M. C., Silke, J. & Cusack, C. K. 2015. Living with harmful algal blooms in a changing world: strategies for modeling and mitigating their effects in coastal marine ecosystems. In: J. F. Shroder, J. T. Ellis & D. J. Sherman (eds.). *Coastal and Marine hazards, risks and Disasters*, pp. 495–561. Elsevier, Amsterdam.
- Arzul, G., Gentien, P., Bodennec, F. 1998. Potential toxicity of microalgal polyunsaturated fatty acids (PUFAs). In: G. Baudimant, J.H. Guézennec, P. Roy & J.F Samain (eds.). *Marine lipids*, pp. 53–62. IFREMER, Plouzané, Francia.
- 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: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2015.04.006>
- Attaran-Fariman, G., De Salas, M.F., Negri, A.P. & Bolch, C.J.S. 2007. Morphology and phylogeny of *Gymnodinium trapeziforme* sp. nov. (Dinophyceae): a new dinoflagellate from the southeast coast of Iran that forms microreticulate resting cysts. *Phycologia* 46: 644–656. DOI: <https://doi.org/10.2216/07-05.1>
- Attaran-Fariman, G. & Bolch, C.J.S. 2014. Morphology and genetic affinities of a novel *Chattonella* isolate (Raphidophyceae) isolated from Iran's south coast (Oman Sea). *Turkish Journal of Botany* 38: 156–168. DOI: <https://doi.org/10.3906/bot-1210-3>
- Bachy, C., Hehenberger, E., Ling, Y.C., Needham, D.M., Strauss, J., Wilken, S. & Worden, A. Z. 2022. Marine Protists: A Hitchhiker's Guide to their Role in the Marine
-

-
- Microbiome. In: L.J. Stal. & M.S. Cretoiu (eds.). *The Marine Microbiome*, pp. 159–241. Springer, Cham. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-90383-1_4
- Band-Schmidt, C.J., Morquecho, L., Hernández-Becerril, D.U., Reyes-Salinas, A. & Bravo-Sierra, E. 2004. Raphidophyceans on the coasts of Mexico. *Hydrobiologia* 515: 79–89. DOI: <https://doi.org/10.1023/b:hydr.0000027320.00977.8b>
- Band-Schmidt C.J., Bustillos-Guzmán J., Morquecho L., Gárate-Lizárraga I., Alonso-Rodríguez R., Reyes-Salinas A., Erler K. & Luckas B. 2006. Variations of PSP toxin profiles during different growth phases in *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) strains isolated from three locations in the Gulf of California, Mexico. *Journal of Phycology* 42: 757–768. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00234.x>
- Band-Schmidt, C.J., Martínez-López, A., Bustillos-Guzmán, J.J., Carreón-Palau, L., Morquecho, L., Olguín-Monroy, N.O., Zenteno-Savín, T., Mendoza-Flores, A., González-Acosta, B., Hernández-Sandoval, F.H. & Tomas, C. 2012. Morphology, biochemistry, and growth of raphidophyte strains from the Gulf of California. *Hydrobiologia* 693: 81–97. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1088-y>
- Band-Schmidt, C.J., Zumaya-Kiguera, 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: 101846. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101846>
- Balech, E. 1964a. Los estudios fitoplanctónicos regionales. Estado actual en latinoamérica y normas a seguir. *Revista del Instituto de Investigaciones Pesqueras* 1: 243–248.
- Balech E. 1964b. El plancton de Mar del Plata durante el período 1961–1962. *Boletín del Instituto de Biología Marina* 4: 1–49.
- Beck, M.W., Heck, K.L., Able, K.W., Childers, D.L., Eggleston, D.B., Gillanders, B.M., Halpern, B., Hays, C.G., Hoshino, K., Minello, T.J., Orth, R.J., Sheridan, P.F. & Weinstein, M.P. 2001. The identification, conservation, and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates: a better understanding of the habitats that serve as nurseries for marine species and the factors that create site-specific variability in nursery quality will improve conservation and
-

-
- management of these area. *BioScience* 51: 633–641. DOI: [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[0633:TICAMO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[0633:TICAMO]2.0.CO;2)
- Ben Ali, A., De Baere, R., De Wachter, R. & Van de Peer, Y. 2002. Evolutionary relationships among heterokont algae (the autotrophic Stramenopiles) based on combined analyses of small and large subunit ribosomal RNA. *Protist* 153: 123–132. DOI: <https://doi.org/10.1078/1434-4610-00091>
- Berasategui, A. A., Dutto, M. S., López-Abbate, C. & Guinder, V. A. 2021. Plankton Ecology and Biodiversity in the Bahía Blanca Estuary. In: S. M. Fiori & P. D. Pratolongo (eds.). *The Bahía Blanca Estuary*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-66486-2_5
- Bianchi, T.S. 2007. Estuarine science and biogeochemical cycles. In: T.S. Bianchi (ed.). *Biogeochemistry of Estuaries*, pp. 3–10. Oxford University Press, New York, EE. UU.
- Billard, C. 1992. *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae), planktonic marine alga reported for the first time in France. *Cryptogamie Algologie* 13: 225–231.
- Blanchet, F.G, Legendre, P. & Borcard, D. 2008. Forward selection of explanatory variables. *Ecology* 89: 2623–2632.
- Bols, N.C., Barlian, A., Chirino–Trejo, M., Caldwell, S.J., Goegan, P. & Lee, L.E. 1994. Development of a cell line from primary cultures of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), gills. *The Journal of Fish Disease* 17: 601–611. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1994.tb00258.x>
- Branco, S., Menezes, M., Alves-de-Souza, C., Domingos, P., Schramm, M.A. & Proença, L.A.O. 2014. Recurrent blooms of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) in the Piraquê Channel., Rodrigo de Freitas Lagoon, southeast Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 74: 529–537. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/bjb.2014.0074>
- Branco, S., Almeida, L.L., Alves-de-Souza, C. & Oliveira, M.M.M. 2019. Morphological and genetic characterization of bloom-forming Raphidophyceae from Brazilian coast. *Phycological Research* 67: 279–290. DOI: <https://doi.org/doi.org/10.1111/pre.12377>
- Braverman, M.S. 2011. Historia de vida temprana de la corvina rubia (*Micropogonias furnieri*, Sciaenidae) en el estuario del Río de la Plata. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Braverman, M.S., Acha, M.E., Gagliardini, D.A. & Rivarossa, M. 2009. Distribution of
-

-
- whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*, Desmarest 1823) larvae in the Río de la Plata estuarine front. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 82(4): 557–565. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2009.02.018>
- Bridgers, A., McConell, E., Naar, J., Waidner, A. Tomas, L. & Tomas, C. 2004. Comparison of regional clones of the genus *Chattonella* and *Fibrocapsa* for growth characteristics and potential toxin production. In: K. A. Steidinger, J. H. Landsberg, C. R. Tomas & G. A. Vargo (eds.). *Proceedings of the Xth International Conference on Harmful Algae*, pp. 405–407. International Society for the Study of Harmful Algae and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.
- Bustillos-Guzmán J.J., Band-Schmidt C.J., Durán-Riveroll L.M., Hernández-Sandoval F.E., López-Cortés D.J., Núñez-Vázquez E.J., Cembella A. & Krock B. 2015. Paralytic toxin profile of the marine dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham from the Mexican Pacific as revealed by LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 32: 381–394. DOI: <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.1000978>
- Calliari, D., Gómez, M. & Gómez, N. 2005. Biomass and composition of the phytoplankton in the Río de la Plata: Large-scale distribution and relationship with environmental variables during a spring cruise. *Continental Shelf Research* 25: 197–210. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.csr.2004.09.009>
- Calliari, D., Brugnoli, E., Ferrari, G. & Vizziano, D. 2009. Phytoplankton distribution and production along a wide environmental gradient in the South-West Atlantic off Uruguay. *Hydrobiologia* 620: 47–61. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10750-008-9614-7>
- Capriulo, G.M., Smith, G., Troy, R., Wikfors, G.H., Pellet, J. & Yarish, C. 2002. The planktonic food web structure of a temperate zone estuary, and its alteration due to eutrophication. *Hydrobiologia* 475/476: 263–333. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1020387325081>
- Carbonell, J.J. & Pascual, A. 1925. Una *Melosira* nueva para el Río de la Plata. *Physis* 8: 106–107.
- Carreto, J.I., Negri, R.M., & Benavides, H.R. 1986. Algunas características del florecimiento del fitoplancton en el frente del Río de La Plata. *Revista de*
-

- Carreto, J.I., Elbusto, C., Sancho, H., Carignan, M.O., Yasumoto, T. & Oshima, Y. 1996. Comparative studies on paralytic shellfish toxin profiles of marine snails, mussels and an *Alexandrium tamarense* isolate from the Mar del Plata coast (Argentina). *Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero* 10: 101–107.
- Carreto, J.I., Montoya, N.G. & Cucchi Colleoni, A.D. 1998. *Alexandrium tamarense* blooms and shellfish toxicity in the Argentine sea: a retrospective view. In: B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt. (eds.). *Harmful Microalgae*, pp. 131–134. IOC-UNESCO, Santiago de Compostela, España.
- Carreto, J.I., Montoya, N.G., Benavides, H.R., Guerrero, R.A. & Carignan, M.O. 2003. Characterization of spring phytoplankton communities in the Río de La Plata maritime front using pigment signatures and cell microscopy. *Marine Biology* 143(5): 1013–1027. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00227-003-1147-z>
- Carreto, J.I., Carignan, M.O., Montoya, N.G., & Cucchi Colleoni, A.D. 2007. Ecología del fitoplancton en los sistemas frontales del Mar Argentino. *El Mar Argentino y Sus Recursos Pesqueros* 5(May): 11–31.
- Carreto, J.I., Montoya, N., Akselman, R., Carignan, M.O., Silva, R.I. & Cucchi Colleoni, D.A. 2008. Algal pigment patterns and phytoplankton assemblages in different water masses of the Río de la Plata maritime front. *Continental Shelf Research* 28: 1589–1606. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.csr.2007.02.012>
- Carstensen, J., Klais, R. & Cloern, J. E. 2015. Phytoplankton blooms in estuarine and coastal waters: Seasonal patterns and key species. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 162: 98 – 109. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecss.2015.05.005>
- 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: 461–469.
- Chang, F.H., MacKenzie, L., Till, D., Hannah, D. & Rhodies, L. 1995. The first toxic shellfish outbreaks and the associated phytoplankton blooms in early 1993 in New Zealand. In: P. Lassus, G. Arzul, E. Erard, C. Gentien, C. Marcaillou (eds.). *Harmful Marine Algal Blooms: Technique et Documentation*, pp. 145–150. Intercept Ltd., Lavoisier.

-
- Chang, F.H., McVeagh, M., Gall, M. & Smith, P. 2012. *Chattonella globosa* is a member of Dictyochophyceae: reassignment to *Vicicitus* gen. nov., based on molecular phylogeny, pigment composition, morphology and life history. *Phycologia* 51: 403–420. DOI: <https://doi.org/10.2216/10-104.1>
- Cho, K., Ueno, M., Liang, Y., Kim, D. & Oda, T. 2022. Generation of reactive oxygen species (ROS) by harmful algal bloom (HAB)-forming phytoplankton and their potential impact on surrounding living organisms. *Antioxidants* 11, Article 206. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox11020206>
- 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: 953–960.
- Cucchiari, E., Guerrini, F., Penna, A., Totti, C., & Pistocchi, R. 2008. Effect of salinity, temperature, organic and inorganic nutrients on growth of cultured *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae) from the northern Adriatic Sea. *Harmful Algae* 7: 405–414. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2007.09.002>
- Daugbjerg, N., Hansen, G., Larsen, J. & Moestrup, Ø. 2000. Phylogeny of some of the major genera of dinoflagellates based on ultrastructure and partial LSU rDNA sequence data, including the erection of three new genera of unarmoured dinoflagellates. *Phycologia* 39: 302–317. DOI: <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-39-4-302.1>
- Day, J. W., Crump, B. C., Kemp, M. W. & Yáñez-Arancibia, A. 2013. *Estuarine Ecology Second Edition*. Wiley-Blackwell. Wiley, Hoboken, Nueva Jersey.
- de Boer, K. M., Tyl, M. R., Vrieling, E. G. & van Rijssel, M. 2004. Effects of salinity and nutrient conditions on growth and haemolytic activity of *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae). *Aquatic Microbial Ecology* 37: 171–181. DOI: <https://doi.org/10.3354/ame037171>
- de Boer, K. M., Koolmees, E. M., Vrieling, E. G., Breeman, A. M. & van Rijssel, M. 2005. Temperature responses of three *Fibrocapsa japonica* strains (Raphidophyceae) from different climate regions. *Journal of Plankton Research* 27: 47–60. DOI: <https://doi.org/10.1093/plankt/fbh149>
- de Boer, K. M., Tyl, M. R., Fu, M., Kulk, G., Liebezeit, G., Tomas, C. R., Lenzi, A., Naar, J., Vrieling, E. G. & van Rijssel, M. 2009. Haemolytic activity within the species
-

-
- Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae). *Harmful Algae* 8: 669–705. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.02.001>.
- de Boer, M.K., Boerée, C., Sjollema, S.B., de Vries, T., Rijnsdorp, A.D. & Buma A.G.J. 2012. The toxic effect of the marine raphidophyte *Fibrocapsa japonica* on larvae of the common flatfish sole (*Solea solea*). *Harmful Algae* 17: 92–101.
- Demura, M., Noël, M.-H., Kasai, F., Watanabe, M. & Kawachi, M. 2009. Taxonomic revision of *Chattonella antiqua*, *C. marina* and *C. ovata* (Raphidophyceae) based on their morphological characteristics and genetic diversity. *Phycologia* 48: 518–535. DOI: <https://doi.org/10.2216/09.98.1>
- Díaz, J.M, Plummer, S., Tomas, C. & Alves-de-Souza, C. 2018. Production of extracellular superoxide and hydrogen peroxide by five marine species of harmful bloom-forming algae. *Journal of Plankton Research* 40: 667–677. DOI: <https://doi.org/10.1093/plankt/fby043>
- Doan, N.H. & Moestrup, Ø. 2004. Raphidophyceae. In: J. Larsen & N.L. Nguyen (eds.). *Potentially toxic microalgae of Vietnamese waters*, pp. 147–158. Opera Botanica 140.
- Dorantes–Aranda, J.J., Waite, T.D., Godrant, A., Rose, A.L., Tovar, C.D., Woods, G.M. & Hallegraeff, G.M. 2011. Novel application of a fish gill cell line assay to assess ichthyotoxicity of harmful marine microalgae. *Harmful Algae* 10: 366–373. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.01.002>
- Dorantes-Aranda, J.J. 2012. Development and novel application of an in vitro fish gill assay to elucidate the ichthyotoxic mechanism of the microalga *Chattonella marina* (Raphidophyceae). Tesis Doctoral. Universidad de Tasmania.
- Dorantes-Aranda, J.J., Nichols, P.D., Waite, T.D. & 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: 427–438. DOI: <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: e0133549. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133549>
-

-
- Durán-Riveroll, L.M., Krock, B., Cembella, A., Peralta-Cruz, J., Bustillos-Guzmán, J.J. & Band-Schmidt, C.J. 2017. Characterization of Benzoyl Saxitoxin Analogs from the Toxigenic Marine Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* by Hydrophilic Interaction Liquid Ion-Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Natural Products Chemistry & Research* 5: Article 1000275. DOI: <https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000275>
- Edwardsen, B., Shalchian-Tabrizi, K., Jakobsen, K.S., Medlin, L.K., Dahl, E., Brubak, S. & Paasche, E. 2003. Genetic variability and molecular phylogeny of *Dinophysis* species (Dinophyceae) from Norwegian waters inferred from single cell analyses of rDNA. *Journal of Phycology*. 39: 395–408. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2003.01252.x>
- Elbrächter, M. & Hoppenrath, M. 2009. Dinoflagellates. In: M. Hoppenrath, M. Elbrächter & G. Drebes (eds.). *Marine phytoplankton. Selected microphytoplankton species from the North Sea around Helgoland and Sylt*, pp. 113–206. Kleine Senckenberg-Reihe 49, E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obermiller), Stuttgart, Alemania.
- Ellegaard, M. & Oshima, Y. 1998. *Gymnodinium nolleri* Ellegaard et Moestrup sp. ined. (Dinophyceae) from Danish waters, a new species producing *Gymnodinium catenatum*-like cysts: molecular and toxicological comparisons with Australian and Spanish strains of *Gymnodinium catenatum*. *Phycologia* 37: 369–378. DOI: <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-37-5-369.1>
- Engesmo, A., Eikrem, W., Seoane, S., Smith, K., Edwardsen, B., Hofgaard, A. & Tomas, C. R. 2016. New insights into the morphology and phylogeny of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae), with the description of *Heterosigma minor*. *Phycologia* 55: 279–294. DOI: <https://doi.org/10.2216/15-115.1>
- Estrada M., Sánchez F.J. & Fraga S. 1984. *Gymnodinium catenatum* (Graham) en las rías gallegas (NO de España). *Investigación Pesquera* 48: 31–40.
- Ferrari, G., Méndez, S.M. & Brazeiro, A. 2000. *Dinophysis acuminata* associated to diarrhetic shellfish poisoning reports in Uruguay. *Frente Marítimo* 19: 91–95.
- Ferrario, M.E., Sar, E.A. & Sala, S.E. 1995. Metodología básica para el estudio del fitoplancton con especial referencia a las diatomeas. In: K. Alveal, M.E. Ferrario,
-

-
- E.C. Oliveira & E. Sar (eds.). *Manual de Métodos Ficológicos*, pp. 1–23. Universidad de Concepción, Chile.
- Ferrario, M.E., Sar, E.A. & Salas, E. 2002. Diatomeas potencialmente tóxicas del Cono Sur Americano. In: E.A. Sar, M.E. Ferrario & B. Reguera (eds.). *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*, pp. 167–194. Instituto Español de Oceanografía, Madrid, España.
- Flindt, M.R., Pardal, M.A., Lillebø, A.I., Martins, I. & Marques, J.C. 1999. Nutrient cycling and plant dynamics in estuaries: a brief review. *Acta Oecologica* 20: 237–248. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1146-609X\(99\)00142-3](https://doi.org/10.1016/S1146-609X(99)00142-3)
- 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: Article 577. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins14090577>
- Fossat, B., Porthé-Nibelle, J., Sola, F., Masoni, A., Gentien, P. & Bodennec, G. 1999. Toxicity of fatty acid 18:5n3 from *Gymnodinium cf. mikimotoi*: II. Intracellular pH and K⁺ uptake in isolated trout hepatocytes. *Journal of Applied Toxicology* 19: 275–278. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1263\(199907/08\)19:4<275::AID-JAT578>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1263(199907/08)19:4<275::AID-JAT578>3.0.CO;2-B)
- Fu, M., Koulman, A., van Rijssel, M., Lützen, A., de Boer, M. K., Tyl, M. R. & Liebezeit, G. 2004. Chemical characterization of three haemolytic compounds from the microalgal species *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae). *Toxicon* 43: 355–363. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.09.012>
- Fraga, S., Bravo, I., Delgado, M., Franco, J. M. & Zapata M. 1995. *Gyrodinium impudicum* sp. nov. (Dinophyceae), a non toxic, chain-forming, red tide dinoflagellate. *Phycologia* 34: 514–521. DOI: <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-34-6-514.1>
- Framiñan, M.B. & Brown, O.B. 1996. Study of the Rio de la Plata turbidity front. Part I: Spatial and temporal distribution. *Continental Shelf Research* 16: 1259–1282. DOI: [https://doi.org/10.1016/0278-4343\(95\)00071-2](https://doi.org/10.1016/0278-4343(95)00071-2)
- Frenguelli, J. 1933. Diatomeas de Montevideo. *Ostenia* 2: 122–130.
- Frenguelli, J. 1941. XVI Contribución al conocimiento de las diatomeas argentinas. Diatomeas del Río de la Plata. *Revista Museo de la Plata, nueva serie* 3, Botánica
-

15: 213–334.

- Frenguelli, J. 1945. *Nitzschia* (*Nitzschiella*) *ventricosa* Palmer, nerítica en el litoral del Atlántico del Uruguay. *Notas del Museo de la Plata* 10, *Botánica* 50: 137–142.
- García, M.D. & Bonel, N. 2014. Environmental modulation of the plankton community composition and size-structure along the eutrophic intertidal coast of the Río de la Plata estuary, Argentina. *Journal of Limnology* 73: 562–573. DOI: <https://doi.org/10.1016/10.4081/jlimnol.2014.911>
- Garrido, J.L. & Zapata, M. 1997. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of mono- and divinyl chlorophyll forms using pyridine-containing mobile phases and a polymeric octadecylsilica column. *Chromatographia* 44: 43–49. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02466514>
- Godrant, A., Rose, A.L., Sarthou, G.E. & Waite, T.D. 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: 682–692. DOI: <https://doi.org/10.4319/lom.2009.7.682>
- Gómez, N., Hualde, P.R., Licursi, M. & Bauer, D.E. 2004. Spring phytoplankton of Río de la Plata: A temperate estuary of South America. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 61: 301–309. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2004.05.007>
- Gómez, N. 2014. Phytoplankton of the Río de la Plata Estuary. Freshwater Phytoplankton of Argentina. *Advances in Limnology* 65: 167–181. DOI: <https://doi.org/10.1127/1612-166X/2014/0065-0040>
- Goodwin, T. 1980. Algae. In: T. Goodwin (ed.). *The biochemistry of the Carotenoids. Vol. 1: Plants, 2nd edition*, pp. 246. Chapman and Hall, New York, EE. UU.
- Graham H. 1943. *Gymnodinium catenatum*, a new dinoflagellate from the Gulf of California. *Transactions of the American Microscopical Society* 62: 259–261. DOI: <https://doi.org/10.2307/3223028>
- Gu G., Liu T., Vale P. & Luo Z. 2013. Morphology, phylogeny and toxin profiles of *Gymnodinium inusitatum* sp. nov., *Gymnodinium catenatum* and *Gymnodinium microreticulatum* (Dinophyceae) from the Yellow Sea, China. *Harmful Algae* 28: 97–107. DOI: [10.1016/j.hal.2013.06.001](https://doi.org/10.1016/j.hal.2013.06.001)

-
- Gu, H., Luo, Z., Mertens, K.N., Price, A.M., Turner, R.E. & Rabalais, N.N. 2015. Cyst-motile stage relationship, morphology, ultrastructure, and molecular phylogeny of the Gymnodinioid Dinoflagellate *Barrufeta resplendens* comb. nov., formerly known as *Gyrodinium resplendens*, isolated from the Gulf of Mexico. *Journal of Phycology* 51: 990–999. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpy.12342>
- Guerrero, R. A., Piola, A. R., Molinari, G. N., Osiroff, A. P. & Jáuregui, S. I. 2010. *Climatología de temperatura y salinidad en el Río de la Plata y su Frente Marítimo. Argentina-Uruguay*. Mar del Plata: Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero INIDEP. 95 pp.
- Guidi-Rontani, C., Maheswari, U., Jabbari, K. & Bowler, C. 2010. Comparative ecophysiology and genomics of the toxic unicellular alga *Fibrocapsa japonica*. *New Phytologist* 185: 446–458. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03074.x>
- Guinder, V. 2011. Dinámica del fitoplancton en el Estuario de Bahía Blanca y su relación con las variables ambientales en el marco del cambio climático global. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur. Argentina.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2024. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, University of Galway. www.algaebase.org. Consultado: 10/08/2024.
- Hada, Y. 1967. Protozoan plankton of the inland sea, Setonaikai. I. The Mastigophora. *Bulletin of the Suzugamine Women's College of Natural Science* 13: 1–26.
- Hada, Y. 1968. Protozoan plankton of the inland sea, Setonaikai. II. The Mastigophora. *Bulletin of the Suzugamine Women's College of Natural Science* 14: 1–28.
- Hallegraeff, G.M., Munday, B., Baden, D. & Whitney, P.L. 1998. *Chattonella marina* (Raphidophyte) bloom associated with mortality of cultured bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) in south Australia. In: B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt. (eds.), *Harmful Algae*, pp. 93–96. Xunta de Galicia and IOC-UNESCO, Vigo, París.
- Hallegraeff, G.M. 2004. Harmful algal blooms: a global overview. In: G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson, D.M. Cembella & H.O. Enevoldsen (eds.). *Manual on harmful marine microalgae*, pp. 25–49. *Monographs on oceanographic methodology* 11. UNESCO, Francia.
- Hallegraeff G.M., Blackburn S.I. & Doblin M.A. 2012. Global toxicology, ecophysiology
-

-
- and population relationships of the chainforming PST dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Harmful Algae* 14: 130–143. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.018>
- 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: L.A.O. Proença & G.M. Hallegraeff (eds.). *Marine and Fresh-Water Harmful Algae. Proceedings of the 17th International Conference on Harmful Algae*, pp. 150–155. International Society for the Study of Harmful Algae and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.
- Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Belin, C., Dechraoui Bottein, M.-Y., Bresnan, E., Chinain, M., Enevoldsen, H., Iwataki, M., Karlson, B., McKenzie, C.H., Sunesen, I., Pitcher, G.C., Provoost, P., Richardson, A., Schweibold, L., Tester, P.A., Trainer, V. L., Yñiguez, A.T. & Zingone, A. 2021. Perceived global increase in algal blooms is attributable to intensified monitoring and emerging bloom impacts. *Communications Earth & Environment* 2: 117. DOI: <https://doi.org/10.1038/s43247-021-00178-8>
- Hansen, G., Daugbjerg N. & Henriksen, P. 2000. Comparative study of *Gymnodinium mikimotoi* and *Gymnodinium aureolum*, comb. nov. (= *Gyrodinium aureolum*) based on morphology, pigment composition, and molecular data. *Journal of Phycology* 36: 394–410. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2000.99172.x>
- Haque, S.M. & Onoue, Y. 2002. Variation in toxin compositions of two harmful raphidophytes, *Chattonella antiqua* and *Chattonella marina*, at different salinities. *Environmental Toxicology* 17: 113–118. DOI: <https://doi.org/10.1002/tox.10039>
- Hara, Y. & Chihara, M. 1982. Ultrastructure and taxonomy of *Chattonella* (Class Raphidophyceae) in Japan. *Japanese Journal of Phycology* 30: 47–56.
- Hara, Y. & Chihara, M. 1987. Morphology, Ultrastructure and Taxonomy of the Raphidophycean Alga *Heterosigma akashiwo*. *The Botanical Magazine, Tokyo* 100: 151–163.
- Hara, Y. 1990. Raphidophyceae. In: Y. Fukuyo, H. Takano, M. Chihara, M. & K. Matsuoka (eds.). *Red tide organisms in Japan. An illustrated taxonomic guide*, pp. 333–349. Uchida Rokakuho, Tokyo, Japón.
-

-
- Harris, R., Wiebe, P., Lenz, J., Skjoldal, H.R. & Huntley, M. (eds.). 2000. *ICES zooplankton methodology manual*. Elsevier, eBook.
- Henrikson, J.C., Gharfeh, M.S., Easton, A.C., Easton, J.D., Glenn, K.L., Shadfan, M., Mooberry, S.L., Hambright, K.D. & Cichewicz, R.H. 2010. Reassessing the ichthyotoxin profile of cultured *Prymnesium parvum* (golden algae) and comparing it to samples collected from recent freshwater bloom and fish kill events in North America. *Toxicon* 55: 1396–1404. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.02.017>
- Hillebrand, H., Claus–Dieter, D., Kirschtel, D., Pollinger, U. & Zohary, T. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology* 35: 403–424. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3520403.x>
- Hishida, Y., Ishimatsu, A. & Oda, T. 1997. Mucus blockade of lamellar water channels in yellowtail exposed to *Chattonella marina*. *Fisheries Science* 63: 315–316. DOI: <https://doi.org/10.2331/fishsci.63.315>
- Holmes, M.J., Bolch, C.J.S., Green, D.H., Cembella, A.D. & Ming Teo, S.L. 2002. Singapore isolates of the Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) produce a unique profile of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins. *Journal of Phycology* 39: 96–106. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01153.x>
- Horiguchi, T. 1996. *Haramonas dimorpha* gen. et sp. nov. (Raphidophyceae), a new marine raphidophyte from Australian mangrove. *Phycological Research* 44: 143–150. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.1996.tb00043.x>
- Horiguchi, T. & Hoppenrath, M. 2003. *Haramonas viridis* sp. nov. (Raphidophyceae, Heterokontophyta), a new sand-dwelling raphidophyte from cold temperate waters. *Phycological Research* 51: 61–67. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1440-1835.2003.00294.x>
- Hosoi-Tanabe, S., Honda, D., Fukaya, S., Otake, I., Inagaki, Y. & Sako, Y. 2007. Proposal of *Pseudochattonella verruculosa* gen. nov., comb. nov. (Dictyochophyceae) for a former raphidophycean alga *Chattonella verruculosa*, based on 18S rDNA, phylogeny and ultrastructural characteristics. *Phycological Research* 55: 185–192. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2007.00461.x>
-

-
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
- Hulburt, E. M. 1965. Flagellates from brackish waters in the vicinity of Woods Hole, Massachusetts. *Journal of Phycology* 1: 87–94.
- Ihaka, R. & Gentleman, R. 1996. R: a language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* 5: 299–314. DOI: <https://doi.org/10.2307/1390807>
- Imai, I. & Itakura, S. 1999. Importance of cysts in the population dynamics of the red tide flagellate *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Marine Biology* 133: 755–762. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002270050517>
- Imai, I. & Yamaguchi, M. 2012. Life cycle, physiology, ecology and red tide occurrences of the fish-killing raphidophyte *Chattonella*. *Harmful Algae* 14: 46–70. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.014>
- Ishimatsu, A., Tsuchiyama, T., Yoshida, M., Sameshima, M., Pawluk, M. & Oda, T. 1991. Effect of *Chattonella* exposure on acid-base status of the yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57: 2115–2120. DOI: <https://doi.org/10.2331/suisan.57.2115>
- Ishimatsu, A., Sameshima, M., Tamura, A. & Oda, T. 1996. Histological analysis of the mechanisms of *Chattonella*-induced hypoxemia in yellowtail. *Fisheries Science* 62: 50–58. DOI: <https://doi.org/10.2331/fishsci.62.50>
- Itakura, S., Nagasaki, K., Yamaguchi, M. & Imai, I. 1996. Cyst formation in the red tide flagellate *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Journal of Plankton Research* 18: 1975–1979. DOI: <https://doi.org/10.1093/plankt/18.10.1975>
- Jenkinson, I.R. & Arzul, G. 2001. Mitigation by cysteine compounds of rheotoxicity, cytotoxicity and fish mortality caused by the dinoflagellates, *Gymnodinium mikimotoi* and *G. cf. maguelonnense*. In: G. Hallegraeff, C.J.S Bolch, S.I. Blackburn & R. Lewis (eds.). *Harmful Algal Blooms 2000*, pp. 461–464. IOC-UNESCO, Paris, Francia.
- Kai, A.K.L., Cheung, Y.K., Yeung, P.K.K. & Wong, J.T.Y. 2006. Development of single-cell PCR methods for the Raphidophyceae. *Harmful Algae* 5: 649–657. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2006.01.002>
-

-
- Kamikawa, R., Masuda, I., Oyama, K., Yoshimatsu, S. & Sako, Y. 2007. Genetic variation in mitochondrial genes and intergenic spacer region in harmful algae *Chattonella* species. *Fisheries Science* 73: 871–880. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2007.01408.x>
- Kang, N.S., Jeong, H.J., Moestrup, Ø, Lee, S.Y., Lim, A., Suk, Jang, T.Y., Lee, K.H., Lee, M.J., Jang, S.H., Potvin, E., Lee, S.K. & Noh, J.H. 2013. *Gymnodinium smaydae* n. sp., a new planktonic phototrophic dinoflagellate from the coastal waters of Western Korea: morphology and molecular characterization. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 61: 182-203. DOI: <https://doi.org/10.1111/jeu.12098>
- Kempton, J., Keppler, C.K., 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: 235–240. DOI: <https://doi.org/10.3389/10.1016/j.hal.2007.08.003>
- Khan, S., Arakawa, O. & Onoue, Y. 1995. Effects of physiological factors on morphology and motility of *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae). *Botanica Marina* 38: 347–353. DOI: <https://doi.org/10.1515/botm.1995.38.1-6.347>
- Khan, S., Arakawa, O. & Onoue, Y. 1996. A toxicological study of the marine phytoflagellate, *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae). *Phycologia* 35: 239–244. DOI: <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-35-3-239.1>
- Khan, S., Arakawa, O. & Onoue, Y. 1996b. Neurotoxin production by a chloromonad *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae). *Journal of the World Aquaculture Society* 27: 254–263. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1996.tb00607.x>
- Khan, S., Arakawa, O. & Onoue, Y. 1997. Neurotoxin in a toxic red tide of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) in Kagoshima Bay, Japan. *Aquaculture Research* 28:9–14. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1997.t01-1-00823.x>
- Ki, J.-S. & Han, M.-S. 2007a. Nuclear rDNA and chloroplast rbcL, rbcS and IGS sequence data, and their implications from the Japanese, Korean, and North American harmful algae, *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Environmental Research* 103: 299–304. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2006.08.014>
- Ki, J.-S. & Han, M.-S. 2007b. Cryptic long internal repeat sequences in the ribosomal DNA ITS1 gene of the dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* (Dinophyceae): a 101

-
- nucleotide six-repeat track with a palindrome-like structure. *Genes & Genetic Systems* 82: 161–166. DOI: <https://doi.org/10.1266/ggs.82.161>
- Kim, C.S., Lee, S. G., Lee, C.K., Kim, H.G. & Jung, J. 1999. Reactive oxygen species as causative agents in the ichthyotoxicity of the red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*. *Journal of Plankton Research* 21: 2105–2115. DOI: <https://doi.org/10.1093/plankt/21.11.2105>
- Kim, J.D., Yamaguchi, K. & Oda, T. 2006. Nitric oxide synthase-like enzyme mediated nitric oxide generation by harmful red tide phytoplankton, *Chattonella marina*. *Journal of Plankton Research* 28: 613–620. DOI: <https://doi.org/10.1093/plankt/fbi145>
- Kim, J.D. & Oda, T. 2010. Possible factors responsible for the fish-killing mechanisms of the red tide phytoplankton, *Chattonella marina* and *Cochlodinium polykrikoides*. In: D. Kim & H.-J. Lie (eds.). *Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East China Sea*, pp. 245–268. Terrapub and Nagasaki University, Tokyo, Japón.
- Kjørboe, T. 1993. Turbulence, phytoplankton cell size, and the structure of pelagic food webs. *Advances in marine biology* 29: 1–72. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(08\)60129-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(08)60129-7)
- Klöpper, S., John, U. & Cembella, A. D. 2008. A new Mediterranean genotype of *Fibrocapsa* sp. In: Ø. Moestrup (ed.). *Proceedings of the 12th International Conference on Harmful Algae*, pp. 259–261. International Society for the Study of Harmful Algae, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.
- Klöpper, S., John, U., Zingone, A., Mangoni, O., Kooistra W.H.C.F. & Cembella, A. 2013. Phylogeny and morphology of *Chattonella* (Raphidophyceae) species from the Mediterranean Sea: what is *C. subsalsa*?. *European Journal of Phycology* 48: 79–92. DOI: <https://doi.org/10.1080/09670262.2013.771412>
- Kogan, M. 2005. Estudio de la composición específica, abundancia y distribución espacial del microzooplancton (protozoos y micrometazoos) en el estuario del Río de la Plata (Argentina–Uruguay). Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Buenos Aires. Argentina.
- Komárek, J. 2013. *Cyanoprokaryota*. Springer Spektrum, Berlin.
- Kooistra, W. H. C. F., de Boer, M. K., Vrieling, E. G., Connel, L. B. & Gieskes, W. W. C. 2001. Variaton along ITS markers across strains of *Fibrocapsa japonica*
-

-
- (Raphidophyceae) suggests hybridisation events and recent range expansion. *Journal of Sea Research* 46: 213–222. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1385-1101\(01\)00086-7](https://doi.org/10.1016/S1385-1101(01)00086-7)
- Kromkamp, J. & Peene, J. 2005. Changes in phytoplankton biomass and primary production between 1991 and 2001 in the Wesyerschelde estuary (Belgium/The Netherlands). *Hydrobiologia* 540: 117–126. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10750-004-7124-9>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547–1549. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. & Higgins, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947–2948. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- Larsen J. & Nguyen N.L. 2004. Gymnodiniales. In: J. Larsen & N.L. Nguyen (eds.). *Potentially toxic microalgae of Vietnamese waters*, pp. 117–133. Opera Botanica 140.
- Larsen, T. 2023. Chemistry and analytic methods - how to deal with the many congeners?. In: G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson, K. Davidson, F. Gianella, P.J. Hansen, H. Hegaret, M. Iwataki, T.O. Larsen, J.I. Mardones, L. MacKenzie & J.E. Rensel (eds.). *Fish-killing Marine Algal Blooms: Causative Organisms, Ichthyotoxic Mechanisms, Impacts and Mitigation*, pp. 28–35. UNESCO-IOC/SCOR, Paris, Francia.
- Lassus P., Chomérat N., Hess P. & Nézan E. 2016. Toxic and harmful microalgae of the world ocean/Micro-algues toxiques et nuisibles de l'océan mondial. *IOC Manuals and Guides* 68: 1–523.
- Legendre, P. & Gallagher, E. D. 2001. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia* 129: 271–280. DOI: <https://doi.org/10.1007/s004420100716>
- Legendre, P., Oksanen, J. & ter Braak C.J.F. 2011. Testing the significance of canonical axes in redundancy analysis. *Methods in Ecology and Evolution* 2: 269–277. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2010.00078.x>
-

-
- Licursi, M., Sierra, M. V. & Gómez, N. 2006. Diatom assemblages from a turbid coastal plain estuary: Río de la Plata (South America). *Journal of Marine Systems* 62: 35–45. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2006.03.002>
- Liu, W., Au, D.W.T., Anderson, D.M., Lam, P.K.S. & Wu, R.S.S. 2007. Effects of nutrients, salinity, pH and light:dark cycle on the production of reactive oxygen species in the alga *Chattonella marina*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 346: 76–86. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2007.03.007>
- Liu M., Gu H., Krock B., Luo Z. & Zhang Y. 2020. Toxic dinoflagellate booms of *Gymnodinium catenatum* and their cysts in Taiwan Strait and their relationship to global populations. *Harmful Algae* 97: 101868. DOI: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(87\)90267-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(87)90267-4)
- Loeblich, A. R. I. & Fine, K. 1977. Marine chloromonads: more widely distributed in neritic environments than previously thought. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 90: 388–399.
- Lum, W.M., Benico, G., Doan-Nhu, H., Furio, E., Leaw, C.P., Leong, S.C.Y., Lim, P.T., Lim, W.A., Lirdwitayaprasit, T., Lu, S., Muawanah, Nguyen, N.V., Orlova, T.Y., Rachman, A., Sakamoto, S., Takahashi, K., Teng, S.T., Thoha, H., Wang, P., Yñiguez, A.T., Wakita, K. & Iwataki, M. 2021. The harmful raphidophyte *Chattonella* (Raphidophyceae) in Western Pacific: its red tides and associated fisheries damage over the past 50 years (1969-2019). *Harmful Algae* 107: Article 102070. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.102070>
- Lum, W.M., Lim, H.C., Lau, W.L.S., Law, I.K., Teng, S.T., Benico, G., Leong, S.C.Y., Takahashi, K., Gu, H., Lirdwitayaprasit, T., Leaw, C.P., Lim, P.T. & Iwataki, M. 2022. Description of two new species *Chattonella tenuiplastida* sp. nov. and *Chattonella malayana* sp. nov. (Raphidophyceae) from South China Sea, with a report of wild fish mortality. *Harmful Algae* 118: Article 102322. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2022.102322>
- Lum, W.M., Sakamoto, S., Yuasa, K., Takahashi, K., Kuwata, K., Kodama, T., Katayama, T., Leaw, C.P., Lim, P.T., Takahashi, K. & Iwataki, M. 2023. Comparative effects of temperature and salinity on growth of four harmful *Chattonella* spp. (Raphidophyceae) from tropical Asian waters. *Frontiers in Marine Science* 10: Article 1127871. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1127871>
-

-
- Lund, J.W.G., Kipling, C. & le Cren, E.D. 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia* 11: 143–170. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00007865>
- Luo, Z., Hu Z., Tang, Y., Mertens, K.N., Leaw, C.P., Lim, P.T., Teng, S.T., Wang, L. & Gu, H. 2018. Morphology, ultrastructure, and molecular phylogeny of *Wangodinium sinense* gen. et sp. nov. (Gymnodiniales, Dinophyceae) and revisiting of *Gymnodinium dorsalisulcum* and *Gymnodinium impudicum*. *Journal of Phycology* 54: 744–761. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpy.12780>
- Macchi, G.J., Acha, E.M. & Militelli, M.I. 2003. Seasonal egg production pattern of whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) of the Río de la Plata estuary, Argentina–Uruguay. *Fishery Bulletin* 101: 332–342.
- MacKenzie, L. 2008. Ecobiology of the Brevetoxin, Ciguatoxin, and Cyclic Imine Producers. In: L. Botana (ed.). *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection, 2nd ed*, pp. 433–476. CRC Press, Boca Raton, Florida, EE. UU.
- Marcovecchio, J.E., Freije, R.H. & Vazquez Botello, A. 2013. Introducción general. In: J.E. Marcovecchio & R.H. Freije (eds.). *Procesos químicos en estuarios*. Universidad Tecnológica Nacional, Bahía Blanca, Argentina.
- 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. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.hal.2015.09.001>
- Mardones, J.I., Dorantes-Aranda, J.J., Seger, A., Nichols, P. & Hallegraeff, G.M. 2016. Avances en el estudio de ictiotoxinas asociadas con Floraciones Algales Nocivas (FANs). *Salmonexpert* 38: 38–44.
- 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* 6:24. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00024>
- Mardones, J.I., Paredes-Mella, J., Flores-Leñero, A., Yarimizu, K., Godoy, M., Artal, O., Corredor-Acosta, A., Marcus, L., Cascales, E., Espinoza, J. P., Norambuena, L., Garreaud, R. D., González, H. E. & 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: <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2022.102921>
- Marshall, J.A. & Hallegraeff, G.M. 1999. Comparative ecophysiology of the harmful alga *Chattonella marina* (Raphidophyceae) from South Australian and Japanese waters. *Journal of Plankton Research* 21: 1809–1822. DOI: <https://doi.org/10.1093/plankt/21.10.1809>
- Marshall, J.A. & Newman, S. 2002. Differences in photoprotective pigment production between Japanese and Australian strains of *Chattonella marina* (Raphidophyceae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 272: 13–27. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(02\)00034-5](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(02)00034-5)
- Marshall, J.A., Nichols, P.D., Hamilton, B., Lewis, R.J. & Hallegraeff, G.M. 2003. Ichthyotoxicity of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) to damselfish (*Acanthochromis polycanthus*): the synergistic role of reactive oxygen species and free fatty acids. *Harmful Algae* 2: 273–281. DOI: [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: 541–549. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00227-005-1597-6>
- 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: 529–538. DOI: <https://doi.org/10.1093/plankt/fbp135>
- Mee L.D., Espinosa M. & Diaz G. 1986. Paralytic shellfish poisoning with a *Gymnodinium catenatum* red tide on the Pacific coast of Mexico. *Marine Environmental Research* 19: 77–92. DOI: [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(86\)90040-1](https://doi.org/10.1016/0141-1136(86)90040-1)
- Menden-Deuer, S. & Lessard, E.J. 2000. Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. *Limnology and Oceanography* 45: 569–579. DOI: <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.3.0569>
-

-
- Méndez S.M. 1993. Uruguayan red tide monitoring programme: preliminary results (1990–1991). In: T.J. Smayda & Y. Shimizu (eds.). *Toxic phytoplankton blooms in the sea*, pp. 287–289. Elsevier Science Publishing, Amsterdam, Países Bajos.
- Méndez, S.M., Gómez, M., & Ferrari, G. 1997. Planktonic studies of the Río de la Plata and its oceanic front. In: P.G. Wells & G.R. Daborn (eds.). *The Río de la Plata. An Environmental Overview. An ECOPLATA project background report*, pp. 85–112. Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canadá.
- Méndez, S.M. 2006. El impacto de las floraciones algales nocivas, un tema de gestión costera: monitoreo, inicio y dispersión, control y mitigación. In: R. Menafrá, C. Rodríguez, F. Scarabino & D. Conde (eds.). *Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya*, pp. 57–71. Vida Silvestre y Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay.
- Méndez, S.M., Akselman, R. & Tomas, C.R. 2013. First report of *Heterosigma akashiwo*, *Fibrocapsa japonica* and *Chattonella marina* var. *antiqua* in Uruguay. In: K.A. Pagou & G.M. Hallegraeff (eds.). *Proceedings of the 14th International Conference on Harmful Algae*, pp. 134–136. International Society for the Study of Harmful Algae and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.
- Méndez, S.M. & Carreto, J.I. 2018. Harmful Algal Blooms in the Río de la Plata Region. In: M.S. Hoffmeyer, M.E. Sabatini, F.P. Brandini, D.L. Calliari & N.H. Santinelli (eds.). *Plankton ecology of the Southwestern Atlantic*, pp. 477–493. Springer, Cham. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-77869-3>
- Méndez, S. & Ferrari, G. 2003. Floraciones tóxicas de *Gymnodinium catenatum* en aguas uruguayas. *Publicación de la Comisión Técnica Mixta del Frente Marítimo* 19: 97–102.
- Méndez, S.M. & Medina, D. 2004. Twenty-three years of red tide monitoring at fixed stations along the coast of Uruguay. In: K.A. Steidinger, J.H.C. Landsberg, R. Tomas & G.A. Vargo (eds.). *Harmful Algae*, pp. 184–185. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography, IOC-UNESCO, St. Petersburg, EE. UU.
- Méndez, S.M., Akselman, R. & Thomas, C. 2013. First report of *Heterosigma akashiwo*, *Fibrocapsa japonica* and *Chattonella marina* var. *antiqua* in Uruguay. In: C.R. Pagou & G. Hallegraeff (eds.). *Proceedings of the 14th International Conference on Harmful*
-

-
- Algae*, pp. 134–136. International Society for the Study of Harmful Algae, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.
- Méndez, M., Gómez, M. & Ferrari, G. 1998. Estudios planctónicos del Río de la Plata y su frente oceánico. In: P.G. Wells & G.R. Darborn (eds.). *El Río de la Plata. Una revisión ambiental. Un informe de antecedentes del Proyecto EcoPlata*, pp. 87–115. Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canadá.
- Mianzan, H.W., Lasta, C.A., Acha, E.M., Guerrero, R.A., Macchi, G.J. & Bremec, C. 2001. The Río de la Plata estuary, Argentina–Uruguay. In: U. Seeliger & B. Kjerve (eds.). *Costal marine ecosystems of Latin America*, pp. 185–204. *Series Ecological Studies 144*. Springer–Verlag, Berlin, Alemania.
- Miller, J.M., Crowder, L.B. & Moser, M.L. 1985. Migration and utilization of estuarine nurseries by juvenile fishes: an evolutionary perspective. *Contribution in Marine Science* 27: 338–352.
- Montoya, N.G., Negri, R.M. & Carreto, J.I. 2000. Primera detección de toxina amnésica de moluscos en el Mar Argentino asociada a un florecimiento de la diatomea *Pseudo-nitzschia australis* en la Zona Común de Pesca Argentino-Uruguaya. In: *Abstracts of the XV Simposio Científico-Tecnológico de la Comisión Técnica Mixta del Frente Marítimo*, pp. 21–23. Mar del Plata, Argentina.
- Montoya N.G., Akselman R., Carignan M.O. & Carreto J.I. 2006. Pigment profile and toxin composition during a red tide of *Gymnodinium catenatum* Graham and *Myrionecta rubra* (Lohman) Jankowski in coastal waters off Mar del Plata, Argentina. *African Journal of Marine Science* 28: 199–202. DOI: <https://doi.org/10.2989/18142320609504147>
- Mooney, B.D., Dorantes-Aranda, J.J., Place, A.R. & Hallegraeff, G.M. 2011. Ichthyotoxicity of gymnodinioid dinoflagellates: PUFA and superoxide effects in sheepshead minnow larvae and rainbow trout gill cells. *Marine Ecology Progress Series* 426: 213–224. DOI: <https://doi.org/10.3354/meps09036>
- Moreira, D. & Simionato, C. 2019. Hidrología y circulación del estuario del Río de la Plata. *Meteorológica* 44: 1–30.
- Mostaert, A. S., Karsten, U., Hara, Y. & Watanabe, M. M. 1998. Pigments and fatty acids of marine raphidophytes: A chemotaxonomic re-evaluation. *Phycological Research* 46: 213–220. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1440-1835.1998.00138.x>
-

-
- Nei, M. & Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Negri, R.M., Benavides, H.R., Carreto, J.I., Benavides, H.R. & Carreto, J.I. 1988. Algunas características del florecimiento del fitoplancton en el frente del Río de la Plata I: Los sistemas nutritivos. *Publicación de la Comisión Técnica Mixta del Frente Marítimo* 4: 151–161.
- Negri, R.M., Montoya, N. & Carreto, J.I. 2004. *Pseudo-nitzschia australis*, *Mytilus edulis*, *Engraulis anchoita* and domoic acid in the Argentine sea. In: K.A. Steidinger, J.H.C. Landsberg, R. Tomas & G.A. Vargo (eds.). *Harmful Algae*, pp. 139–141. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography, IOC-UNESCO, St. Petersburg, EE. UU.
- Negri A.P., Bolch C.J.S., Geier S., Green D.H., Park T.-G. & Blackburn S.I. 2007. Widespread presence of hydrophobic paralytic shellfish toxins in *Gymnodinium catenatum*. *Harmful Algae*: 774–780. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2007.04.001>
- Nézan, E., Siano, R., Boulben, S., Six, C., Bilien, G., Chèze, K., Duval, A., Le Panse, S., Quéré, J. & Chomérat, N. 2014. Genetic diversity of the harmful family Kareniaceae (Gymnodiniales, Dinophyceae) in France, with the description of *Karlodinium gentienii* sp. nov.: a new potentially toxic dinoflagellate. *Harmful Algae* 40: 75–91. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.10.006>
- Norcross, B.L. & Shaw, R.F. 1984. Oceanic and estuarine transport of fish and larvae: a review. *Transactions of the American Fisheries Society* 113: 153–163. DOI: [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1984\)113<153:OAETOF>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1984)113<153:OAETOF>2.0.CO;2)
- Oda, T., Akaike, T., Sato, K., Ishimatsu, A., Takeshita, S., Muramatsu, T. & Maeda, H. 1992. Hydroxyl radical generation by red tide algae. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 294: 38–43. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90133-h](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90133-h)
- 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: 1658–1662. DOI: <https://doi.org/10.1271/bbb.61.1658>
- Odebrecht, C. & Abreu, P.C. 1995. Raphidophycean in southern Brazil. *Harmful Algae News* 12/13: 4.
-

-
- Okaichi, T. 1989. Red tide problems in the Seto Inland Sea, Japan. In: T. Okaichi, D. M. Anderson & T. Nemoto (eds.). *Red tides, Biology, Environmental Science and Toxicology*, pp. 137–142. Elsevier, New York, EE. UU.
- Oksanen, J. 2015. Multivariate analysis of ecological communities in R: vegan tutorial. *R package version 1*: 1–43. DOI: [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(88\)90124-3](https://doi.org/10.1016/0169-5347(88)90124-3)
- 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: 427–433. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00463>
- Oshima Y., Blackburn S.I. & Hallegraeff G.M. 1993. Comparative study on paralytic shellfish toxin profiles of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from three different countries. *Marine Biology* 116: 471–476. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00350064>
- Oshima Y., Hasegawa M., Yasumoto T., Hallegraeff G.M. & Blackburn S. 1987. Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* as the source of paralytic shellfish toxins in Tasmanian shellfish. *Toxicon* 25: 1105–1111. DOI: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(87\)90267-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(87)90267-4)
- Paerl, H.W., Valdes, L.M., Pinckney, J.L., Piehler, M.F., Dyble, J. & Moisaner, P.H. 2003. Phytoplankton photopigments as indicators of estuarine and coastal eutrophication. *BioScience* 53: 953–964. DOI: [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2003\)053\[0953:PPAIOE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2003)053[0953:PPAIOE]2.0.CO;2)
- Page, B., Page, M. & Noel, C. 1993. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in vitro. *International Journal of Oncology* 3: 473–476. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijo.3.3.473>
- Patil, J.G., Gunasekera, R.M., Deagle, B.E., Bax, N.J. & Blackburn, S.I. 2005. Development and evaluation of a PCR based assay for detection of the toxic dinoflagellate, *Gymnodinium catenatum* (Graham) in ballast water and environmental samples. *Biological Invasions* 7: 983–994. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10530-004-3119-8>
- Prygiel, J. & Coste, M. 2000. *Guide méthodologique pour la mise en oeuvre de l'Indice Biologique Diatomées*. Agences de l'Eau, Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, Direction de l'Eau & CEMAGREF, Francia.

-
- R Core Team. 2022. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org>
- Ramírez, F. J., Guinder, V. A., Ferronato, C. & Krock, B. 2022. Increase in records of toxic phytoplankton and associated toxins in water samples in the Patagonian Shelf (Argentina) over 40 years of field surveys. *Harmful Algae* 118: 102317. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2022.102317>
- Rees A.J.J. & Hallegraeff G.M. 1991. Ultrastructure of the toxic, chain-forming dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Phycologia* 30: 90–105. DOI: <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-30-1-90.1>
- Reñé, A., Satta, C.T., Garcés, E., Massana, R., Zapata, M., Anglès, S. & Camp, J. 2011. *Gymnodinium litoralis* sp. nov. (Dinophyceae), a newly identified bloom-forming dinoflagellate from the NW Mediterranean Sea. *Harmful Algae* 12: 11–25. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.08.008>
- Rhodes, L.L., Haywood, A.J., Ballantine, W.J. & MacKenzie, A.L. 2003. Algal blooms and climate anomalies in north-east New Zealand, August–December 1992. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 27: 419–430.
- Riisberg, I., Orr, R.J.S., Kluge, R., Schalchian-Tabrizi, K., Bowers, H.A., Patil, V., Edvardsen, B. & Jakobsen, K.S. 2009. Seven Gene Phylogeny of Heterokonts. *Protist* 160: 191–204. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.protis.2008.11.004>
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J.C. & Gerhard, D. 2015. Dose-Response analysis using R. *PLoS ONE* 10: e0146021. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>
- Rodríguez, I., Alfonso, A., González-Jartín, J.M., Vieytes, M.R. & Botana, L.M. 2018. A single run UPLC-MS/MS method for detection of all EU-regulated marine toxins. *Talanta* 189: 622–628. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.07.050>
- Round, F.E., Crawford, R.M. & Mann, D.G. 1990. *The Diatoms. Biology and morphology of the genera*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Sampedro, N., Fraga S., Penna, A., Casabianca, S., Zapata, M., Fuentes Grunewald, C., Riobó, P. & Camp, J. 2011. *Barrufeta bravensis* gen. nov. sp. nov. (Dinophyceae); a new bloom-forming species from the Northwest Mediterranean Sea. *Journal of Phycology* 47: 375–392. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.00968.x>
-

-
- Sandoval-Sanhueza, A., Aguilera-Belmonte, A., Basti, L., Figueroa, R.I., Molinet, C., Álvarez, G., Oyanedel, S., Riobó, P., Mancilla-Gutiérrez, 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: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.113234>
- Sanz, N., García-Blanco, A., Gavalás-Olea, A., Loures, P. & Garrido, J.L. 2015. Phytoplankton pigment biomarkers: HPLC separation using a pentafluorophenyl octadecyl silica column. *Methods in Ecology and Evolution* 6: 1199–1209. DOI: <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12406>
- Sar, E. A., Sunesen, I., Lavigne, A. S. & Goya, A. 2010. *Dinophysis* spp. asociadas a detección de toxinas diarreicas (DSTs) en moluscos y a intoxicación diarreica en humanos (Provincia de Buenos Aires, Argentina). *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 45: 451–460.
- Sar, E. A., Sunesen, I., Goya, A. B., Lavigne, A. S., Tapia, E., García, C. & Lagos, N. 2012. First report of diarrhetic shellfish toxins in mollusks from Buenos Aires Province (Argentina) associated with *Dinophysis* spp.: evidence of okadaic acid, dinophysistoxin-1 and their acyl-derivates. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 47: 5–14.
- Sellner, K.G., Doucette, G.J. & Kirkpatrick, G.J. 2003. Harmful algal blooms: causes, impacts and detection. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30: 383–406. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0074-9>
- Schneider, C.A., Rasband, W.S. & Eliceiri, K.W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9: 671–675. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Scholin, C.A., Herzog, M., Sogin, M. & Anderson, D.M. 1994. Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). II. Sequence analysis of a fragment of the LSU rRNA gene. *Journal of Phycology* 30: 999–1011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1994.00999.x>
- Scorzetti, G., Brand, L.E., Hitchcock, G.L., Rein, K.S., Sinigalliano, C.D. & Fell, J.W. 2009. Multiple simultaneous detection of Harmful Algal Blooms (HABs) through a high
-

-
- throughput bead array technology, with potential use in phytoplankton community analysis. *Harmful Algae* 8: 196–211. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.05.003>
- Sieburth, J.McN., Smetacek, V. & Lenz, J. 1978. Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnology and oceanography* 23: 1256–1263. DOI: <https://doi.org/10.4319/lo.1978.23.6.1256>
- Smayda, T.J. & Villareal, T. 1989. The 1985 “brown tide” and the open phytoplankton niche in Narragansett Bay during summer. In: E.M. Cosper, V.M. Bricelj & E.J. Carpenter (eds.). *Novel Phytoplankton Blooms: Causes and Impacts of Recurrent Brown Tides and Other Unusual Blooms*, pp. 165–187. Springer-Verlag, Berlin, Alemania.
- 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: 20–31. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpy.12013>
- Sun, J. & Liu, D. 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 25: 1331–1346. DOI: <https://doi.org/10.1093/plankt/fbg096>
- Sunesen I., Lavigne A.S., Goya A. & Sar E.A. 2014. Episodios de toxicidad en moluscos de aguas marinas costeras de la Provincia de Buenos Aires (Argentina) asociados a algas toxígenas (marzo de 2008-marzo de 2013). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 49: 327–339.
- Sunesen I., Rodríguez Hernández F., Aguiar Juárez D., Tardivo Kubis J.A., Lavigne A.S., Rossignoli A., Riobó P. & Sar E.A. 2020. Morphology, genetics and toxin profile of *Prorocentrum texanum* (Dinophyceae) from Argentinian marine coastal waters. *Phycologia* 59: 634–650. DOI: <https://doi.org/10.1080/00318884.2020.1830552>
- Sunesen, I., Méndez, S.M., Mancera-Pineda, J.E., Dechraoui Bottein, M.-Y. & Enevoldsen H. 2021. The Latin America and Caribbean HAB status report based on OBIS and HAEDAT maps and databases. *Harmful Algae* 102: Article 101920. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101920>
-

-
- Tamura, K. & Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. 10: 512–526. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
- Taylor F.J.R., Fukuyo Y., Larsen J. & Hallegraeff G.M. 2004. Taxonomy of harmful dinoflagellates. In: G.M. Hallegraeff, DM. Anderson & A.D. Cembella (eds.). *Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides 33*, pp. 389–432. IOC-UNESCO, Paris, Francia.
- ter Braak, C.J.F. 1989. CANOCO-an extension of DECORANA to analyze species-environment relationships. *Plant Ecology* 75: 159–160. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00045629>
- The Jamovi Project. 2023. Jamovi (Version 2.3) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>
- Thessen A.E., Patterson D.J. & Murray S.A. 2012. The taxonomic significance of species that have only been observed once: the Genus *Gymnodinium* (Dinoflagellata) as an example. *PLoS One* 7. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044015>
- Thronsen, J. 1996. Note on the taxonomy of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Phycologia* 35: 367.
- Thronsen, J. 1997. The planktonic Marine Flagellates. In: C.R. Tomas (ed.). *Identifying Marine Phytoplankton*, pp. 591–730. Academic Press, San Diego, EE. UU.
- Thronsen, J., Hasle, G.R. & Tangen, K. 2007. *Phytoplankton of Norwegian coastal waters*. Almatel Forlag As, Oslo.
- Tiffany, M.A., Barlow, S.B., Matey, V.E. & Hurlbert, S.H. 2001. *Chattonella marina* (Raphidophyceae), a potentially toxic alga in the Salton Sea, California. *Hydrobiologia* 466: 187–194. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1014503920898>
- Tomas, C.R. 1997. *Identifying marine phytoplankton*. Academic Press, London.
- Tomas, C.R. 1998. Blooms of potentially harmful Raphidophycean flagellates in Florida coastal waters. In: B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.). *Harmful Algae*, pp. 101–103. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, España.
-

-
- Toriumi, S. & Takano, H. 1973. *Fibrocapsa*, a new genus in Chloromonadophyceae from Atsumi Bay, Japan. *Bulletin of Tokai Regional Fisheries Research Laboratory* 76: 25–35.
- Twiner, J.M., Chidiac, P., Dixon, S.J. & Trick, C.G. 2005. Extracellular organic compounds from the ichthyotoxic red tide alga *Heterosigma akashiwo* elevate cytosolic calcium and induce apoptosis in Sf9 cells. *Harmful Algae* 4: 789–800. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2004.12.006>
- Tyrrell, J.V., Scholin, C.A., Bergquist, P.R. & Bergquist, P.L. 2001. Detection and enumeration of *Heterosigma akashiwo* and *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae) using rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Phycologia* 40: 457–467. DOI: <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-40-5-457.1>
- Underwood, G.J.C. & Kromkamp, J. 1999. Primary production by phytoplankton and microphytobenthos in estuaries. In: D.B. Nedwell & D.J. Raffaelli (eds.). *Advances in Ecological Research Estuaries*, pp. 93–154. Academic Press, New York, EE. UU.
- Utermöhl, H. 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *SIL Communications*, 1953–1996 9: 1–38. DOI: <https://doi.org/10.1080/05384680.1958.11904091>
- Van Heukelem, L. & Thomas, C.S. 2001. Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments. *Journal of Chromatography A* 910: 31–49. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(00\)00603-4](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(00)00603-4)
- Vera Sierra, M. 2011. Distribución y ecología trófica en larvas de corvina (*Micropogonias furnieri*) y surel (*Trachurus lathami*) en el Río de la Plata. Tesis de Maestría. Universidad de la República. Uruguay.
- Viana, T.V., Fistarol, G.O., Amario, M., Menezes, R.B., Carneiro, B.L.R., Chaves, D.M., Hargreaves, P.I., Silva-Lima, A.W., Valentin, J.L., Tenenbaum, D.R., Arruda, E.F., Paranhos, R. & Salomon, P. 2019. Massive blooms of *Chattonella subsalsa* Biecheler (Raphidophyceae) in a hypereutrophic tropical estuary Guanabara Bay, Brazil. *Frontiers in Marine Science* 6: Article 85. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00085>
- Vrieling, E.G., Koeman, R.P.T., Nagasaki, K., Ishida, Y., Peperzak, L., Gieskes, W.W.C. & Veenhuis, M. 1995. *Chattonella* and *Fibrocapsa* (Raphidophyceae): first
-

-
- observation of potentially harmful, red tide organisms in Dutch Coastal waters. *Netherlands Journal of Sea Research* 33: 183–191.
- Wang, N., Luo, Z., Mertens, K.N., McCarthy, F.M.G., Gu, L. & Gu, H. 2017. Cyst-motile stage relationship and molecular phylogeny of a new freshwater dinoflagellate *Gymnodinium plasticum* from Plastic Lake, Canada. *Phycological Research* 65: 312–321. DOI: <https://doi.org/10.1111/pre.12190>
- Wood, A.M., Everroad, R.C. & Wingrand, L.M. 2005. Measuring growth rates in microalgal cultures. In: R.A. Andersen (ed.). *Algal culturing techniques*, pp. 269–285. Elsevier Academic Press, New York, EE. UU.
- Worden, A.Z., Follows, M.J., Giovannoni, S.J., Wilken, S., Zimmerman, A.E. & Keeling, P. J. 2015. Rethinking the marine carbon cycle: Factoring in the multifarious lifestyles of microbes. *Science* 347: 735–746. DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1257594>
- Yamaguchi, H., Hoppenrath, M., Takishita, K. & Horiguchi, T. 2008. *Haramonas pauciplastida* sp. nov. (Raphidophyceae, Heterokontophyta) and phylogenetic analyses of *Haramonas* species using small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Phycological Research* 56: 127–138. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2008.00493.x>
- Yoshimatsu, S. 1987. The cyst of *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae) found in bottom sediment in Harima-Nada, eastern Inland Sea of Japan. *Bulletin of the Plankton Society of Japan* 35: 25–31.