



FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

DEPARTAMENTO DE ACUICULTURA

EFECTO DEL ULTRASONIDO EN LA MITIGACIÓN DE
FLORACIONES ALGALES NOCIVAS PARA LA
SALMONICULTURA

Tesis para optar al Grado de Magíster en Acuicultura

Franco Alfredo Cerda Dubó

Profesor Guía: Eduardo Uribe Tapia

COQUIMBO, NOVIEMBRE, 2012



FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

DEPARTAMENTO DE ACUICULTURA

Los miembros de esta Comisión designada para revisar la tesis de Magíster de FRANCO ALFREDO CERDA DUBÓ, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Magíster en Acuicultura.

EDUARDO GASTÓN URIBE TAPIA

CESAR DONOSO FIERRO

GERMÁN MERINO ARANEDA

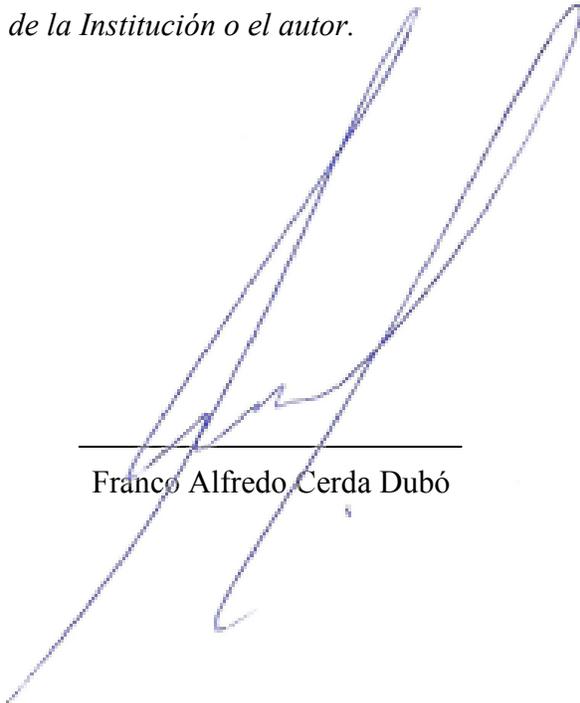


FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

DEPARTAMENTO DE ACUICULTURA

DECLARACIÓN DEL AUTOR

Se permiten citas breves sin permiso especial de la Institución o autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. En cualquier otra circunstancia, se deberá solicitar permiso de la Institución o el autor.



Franco Alfredo Cerda Dubó

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a mi esposa Maribel Silvana Uribe Aracena y a nuestros hijos Diego Andrés y Martín Alonso quienes siempre me han apoyado incondicionalmente en mi carrera profesional y en los momentos difíciles que la vida nos ha puesto por delante.

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a la Universidad Católica del Norte Campus Guayacán y al Centro Regional de Análisis de Recursos y Medio Ambiente-CERAM de la Universidad Austral de Chile sede Puerto Montt, con especial énfasis a los académicos Sr. Eduardo Uribe Tapia y Sra. Miriam Seguel Lizama quienes facilitaron las instalaciones a su cargo, materiales, insumos y ceparios para la realización de este trabajo.

A todos los profesores titulares e invitados del Magíster en Acuicultura versión Puerto Montt que participaron en la fase regular de asignaturas.

A mis amigos y colegas del laboratorio de Producción Primaria del centro costero de la Universidad Católica del norte Inés Pastén, Rosario Díaz y Mauricio Arcos quienes me apoyaron durante mi pasantía en dichas instalaciones.

RESUMEN

Mediante la irradiación de ultrasonido en un reactor experimental, fue posible calcular curvas de regresión lineal para los pares ordenados viabilidad celular v/s intensidad acústica y viabilidad celular v/s tiempo de exposición a ultrasonido en cinco cepas constituyentes de FAN (Floraciones Algales Nocivas) en la salmonicultura chilena. Diferencias significativas y la conformación de grupos homogéneos ($p < 0,05$) en función de la clasificación taxonómica (Diatomeas, Dinoflagelados, Rafidófitas) evidenciaron la singularidad de las dosis sónicas para las cepas analizadas.

Fenómenos de cavitación acústica explican la relación inversa entre intensidad del sonido y la viabilidad celular. Peroxidación lipídica y ciclos de cavitación acústica, son los responsables de la disminución de la viabilidad en función del tiempo de exposición a ultrasonido. La coraza de silicato característica de las diatomeas, le confiere la particularidad de mayor resistencia a irradiación sónica.

El uso de bajas intensidades de onda combinado con tiempos de exposición prolongados, se vislumbra como una alternativa eficiente para el control de FAN a nivel comercial.

Palabras claves: FAN, Diatomeas, Dinoflagelados, Rafidófitas ultrasonido, intensidad acústica, tiempo de exposición, cavitación acústica, peroxidación lipídica.

ABSTRACT

By ultrasound irradiation in an experimental reactor was possible to calculate linear regression curves for cell viability v / s acoustic intensity and cell viability v / s time of exposure to ultrasound for five strains HAB (Harmful Algal Blooms) constituents in Chilean salmon farming. Significant differences and forming homogeneous groups ($p < 0.05$) according to the taxonomic classification (Diatoms, Dinoflagellates, Rafidófitas) showed the uniqueness of sonic dose for the strains analyzed. Acoustic cavitation phenomena explain the inverse relationship between sound intensity and cell viability.

Lipid peroxidation and acoustic cavitation cycles, are responsible for the decreased viability versus time of exposure to ultrasound. The silicate shell characteristic of diatoms, to confer the specificity of greater resistance to sonic irradiation.

The use of low wave intensities combined with long exposure times is seen as an efficient alternative to control HAB commercially.

Keywords: HAB, Diatoms, Dinoflagellates, Rafidófitas, ultrasound, acoustic intensity, exposure time, acoustic cavitation, lipid peroxidation.

INDICE

1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1- Aspectos generales de las floraciones algales nocivas	2
1.2- Principales especies y formas de acción	3
1.2.1.- Dinoflagelados.	3
1.2.2.- Diatomeas.	4
1.2.3.- Rafidofíceas.	4
1.3- Estrategias de mitigación	5
1.4- Sustitutos de prueba	6
2.- ANTECEDENTES	7
2.1- Aspectos generales del sonido	7
2.1.1.- Frecuencia	7
2.1.2.- Intensidad	9
2.2- Aspectos generales del ultrasonido	11
2.2.1.- Aplicaciones en acuicultura	12
3.- HIPÓTESIS	14
4.- OBJETIVOS	14
4.1. - Objetivo General	14
4.2. - Objetivos Específicos	14
5.- MATERIALES Y MÉTODO	15
5.1.- Selección de Cepas	15
5.2.- Determinación de la Viabilidad Celular	15
5.3.- Obtención de las Curvas de Crecimiento Estándar	16
5.3.1- Cálculo de la pendiente de una curva de crecimiento estándar (<i>bt</i>)	16
5.4.- Intensidad de onda ultrasónica	17
5.5.- Tiempo de exposición a ultrasonido	19
6. – RESULTADOS	21
6.1.- Intensidad de onda ultrasónica	21
6.1.1- Curvas de crecimiento	21

6.1.2- Porcentajes de viabilidad	22
6.1.3- Relación intensidad del sonido v/s porcentaje de viabilidad	22
6.1.3.1- Test de validación estadística para pendientes.	23
6.1.3.2- Límites de confianza para los porcentajes de viabilidad.	23
6.1.3.3- Análisis de covarianza (ANCOVA) para pendientes de regresión lineal.	24
6.1.3.4- Test de Tukey para grupos homogéneos.....	24
6.2.- Tiempo de exposición a ultrasonido	24
6.2.1- Curvas de crecimiento	24
6.2.2- Porcentajes de viabilidad	25
6.2.3- Relación tiempo de exposición a ultrasonido v/s porcentaje de viabilidad	26
6.2.3.1- Test de validación estadística para pendientes.	26
6.2.3.2- Límites de confianza para los porcentajes de viabilidad.	27
6.2.3.3- Análisis de covarianza (ANCOVA) para pendientes de regresión lineal.	28
6.2.3.4- Test de Tukey para grupos homogéneos.....	28
7. – DISCUSIÓN	29
8. – CONCLUSIONES.....	41
9. – REFERENCIAS	42
10. – ANEXOS	49

INDICE DE CUADROS

Tabla 1. Selección de cepas y sustitutos de pruebas.	49
Tabla 2. Medio de cultivo para fitoplancton f/2 modificado Uribe (1995).....	49
Tabla 3. Valores de las pendientes (b) para las curvas de crecimiento (intensidad del sonido).....	50
Tabla 4. Porcentajes de viabilidad correspondientes a cepas e intensidad del sonido.	51
Tabla 5. Coeficientes de regresión y correlación para intensidad del sonido v/s porcentaje de viabilidad.....	52
Tabla 6. Test para pendiente predictiva vertical “b” (intensidad del sonido v/s porcentaje de viabilidad).	52
Tabla 7. Errores estándar para coeficientes de regresión lineal (intensidad del sonido v/s porcentaje de viabilidad).	52
Tabla 8. Límites de confianza (LC) para los porcentajes de viabilidad correspondientes a cepas e intensidad del sonido.	53
Tabla 9. Análisis de covarianza para intensidad del sonido v/s viabilidad celular.	54
Tabla 10. Test de Tukey para cepas (intensidad del sonido v/s viabilidad celular).	54
Tabla 11. Valores de las pendientes (b) para las curvas de crecimiento (tiempo de exposición).	55
Tabla 12. Porcentajes de viabilidad correspondientes a cepas y tiempo de exposición a ultrasonido.....	56
Tabla 13. Coeficientes de regresión y correlación para tiempo de exposición a ultrasonido v/s porcentaje de viabilidad.....	57
Tabla 14. Test para pendiente predictiva vertical “b” (tiempo de exposición a ultrasonido v/s porcentaje de viabilidad).	57
Tabla 15. Errores estándar para coeficientes de regresión lineal (tiempo de exposición a ultrasonido v/s porcentaje de viabilidad).	57
Tabla 16. Límites de confianza (LC) para los porcentajes de viabilidad correspondientes a cepas y tiempo de exposición a ultrasonido.	58

Tabla 17. Análisis de covarianza (ANCOVA) para tiempo de exposición a ultrasonido v/s viabilidad celular.	59
Tabla 18. Test de Tukey para cepas (tiempo de exposición a ultrasonido v/s viabilidad celular).....	59
Tabla 19. Valores de presión y temperatura de cavitación asociados a la intensidad del sonido límite.....	60
Tabla 20. Valores de presión y temperatura de cavitación alcanzados en el diseño experimental.....	60
Tabla 21. Comparación de valores para densidad acústica en función de la viabilidad celular y tipo de cepas.	61
Tabla 22. Ranking descendente para la resistencia a ultrasonido en función de la densidad acústica.....	61
Tabla 23. Ciclos de cavitación, UPA y UTA asociados a los tiempos de tratamiento ultrasónicos del diseño experimental.	62
Tabla 24. Tiempos críticos en función de la cepa irradiada.....	62
Tabla 25. Ranking descendente para la resistencia a ultrasonido en función del tiempo de exposición.	62

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de la biomasa total de salmónidos cultivados en Chile por región desde el año 2006 al año 2012 (Servicio Nacional de Pesca, 2012).....	63
Figura 2. Floración algal inocua ocurrida en California causada por la especie <i>Noctiluca</i> sp. (Avaria <i>et al.</i> , 2009).....	63
Figura 3. Mortalidad de <i>Salmo salar</i> provocada por la floración de <i>Chaetoceros convolutus</i> en el mar interior de la XI región de Chile en el año 2008 (archivo personal).	64
Figura 4. Evolución mundial de las floraciones algales nocivas de dinoflagelados productores de veneno paralizante del marisco (VPM) entre el año 1970 y 2005 (Anderson, 2009).....	64
Figura 5. Representación esquemática de un dinoflagelado tipo (Tomas, 1996).	65
Figura 6. Representación esquemática de una frústula de diatomea (Cupp, 1943).	65
Figura 7. Representación esquemática de una microalga rafidofita marina tipo (Sar <i>et al.</i> , 2002).	66
Figura 8. Representación esquemática de la vibración del aire causada por una bocina (Alonso y Finn, 1987).	66
Figura 9. Esquema de una onda tipo en función de la longitud (Serway, 1997).	67
Figura 10. Representación esquemática de bajas y altas frecuencias (Alonso y Finn, 1987).	67
Figura 11. Esquema de una onda tipo en función del tiempo (Serway, 1997).	68
Figura 12. Representación esquemática de la intensidad del sonido (Alonso y Finn, 1987).	68
Figura 13. Representación esquemática de una onda esférica (Marín, 2009).....	69
Figura 14. Nivel de presión sonora bajo el agua para diferentes fuentes emisoras (Yan <i>et al.</i> , 2010).	69
Figura 15. Clasificación de sonido según su frecuencia (Alonso y Finn, 1987).	70
Figura 16. Fuentes naturales y antropogénicas de sonido en el mar (Popper y Ketten, 2008).	70

Figura 17. Comparación de la sensibilidad al sonido entre <i>Salmo salar</i> y los humanos (Hawkins and Johnstone, 1978).	71
Figura 18. Remoción de <i>Microcystis aeruginosa</i> a distintas potencias y tiempos de exposición a ondas ultrasónicas de 20 KHz (Zhang <i>et al.</i> , 2009).	71
Figura 19. Remoción de <i>Microcystis aeruginosa</i> a distintas frecuencias y tiempos de exposición a ondas ultrasónicas de 30W (Zhang <i>et al.</i> , 2009).	72
Figura 20. Porcentajes de remoción obtenidos post aplicación de ultrasonido en los distintos grupos de bacterias y microalgas estudiados a la fecha (Purcell, 2009).	72
Figura 21. Incubación de las cepas en tubos de ensayo.	73
Figura 22. Montaje realizado para el conteo de la concentración celular.	73
Figura 23. Montaje realizado para los tratamientos de ultrasonido.	74
Figura 24. Disposición de los cultivos madre para cada cepa seleccionada.	74
Figura 25. Curvas de crecimiento de <i>Nitzschia</i> sp. para tratamiento patrón; 11.430 W/m ² ; 18.288 W/m ² ; 22.861 W/m ² ; 29.719 W/m ² y 34.291 W/m ²	75
Figura 26. Curvas de crecimiento de <i>Chaetoceros muellerii</i> para tratamiento patrón; 11.430 W/m ² ; 18.288 W/m ² ; 22.861 W/m ² ; 29.719 W/m ² y 34.291 W/m ²	75
Figura 27. Curvas de crecimiento de <i>Skeletonema costatum</i> para tratamiento patrón; 11.430 W/m ² ; 18.288 W/m ² ; 22.861 W/m ² ; 29.719 W/m ² y 34.291 W/m ²	76
Figura 28. Curvas de crecimiento de <i>Heterosigma akashiwo</i> para tratamiento patrón; 11.430 W/m ² ; 18.288 W/m ² ; 22.861 W/m ² ; 29.719 W/m ² y 34.291 W/m ²	76
Figura 29. Curvas de crecimiento de <i>Alexandrium</i> sp para tratamiento patrón; 11.430 W/m ² ; 18.288 W/m ² ; 22.861 W/m ² ; 29.719 W/m ² y 34.291 W/m ²	77
Figura 30. Efecto de la intensidad del sonido en el porcentaje de viabilidad celular para <i>Alexandrium</i> sp, <i>Chaetoceros muellerii</i> , <i>Heterosigma akashiwo</i> , <i>Nitzschia</i> sp. y <i>Skeletonema costatum</i> a 23 KHz de frecuencia y 10 segundos de exposición	77
Figura 31. Curvas de crecimiento de <i>Nitzschia</i> sp. para tratamiento patrón; 10 s; 20 s; 30 s; 40 s y 50 s.	78
Figura 32. Curvas de crecimiento de <i>Chaetoceros muellerii</i> para tratamiento patrón; 10 s; 20 s; 30 s; 40 s y 50 s.	78

Figura 33. Curvas de crecimiento de <i>Skeletonema costatum</i> para tratamiento patrón; 10 s; 20 s; 30 s; 40 s y 50 s.....	79
Figura 34. Curvas de crecimiento de <i>Heterosigma akashiwo</i> para tratamiento patrón; 10 s; 20 s; 30 s; 40 s y 50 s.....	79
Figura 35. Curvas de crecimiento de <i>Alexandrium sp</i> para tratamiento patrón; 10 s; 20 s; 30 s; 40 s y 50 s.	80
Figura 36. Efecto del tiempo de exposición a ultrasonido en el porcentaje de viabilidad celular para <i>Alexandrium sp</i> , <i>Chaetoceros muellerii</i> , <i>Heterosigma akashiwo</i> , <i>Nitzschia sp.</i> y <i>Skeletonema costatum</i> a 23 KHz de frecuencia y 11.430 W/m ² de intensidad.....	80
Figura 37. <i>Spirulina platensis</i> sometida a ultrasonido (Hao et al., 2004).....	81
Figura 38. <i>Nitzschia sp.</i> sometida a dosis ultrasónica de 23 Khz de frecuencia, 34.291 W/m ² de intensidad y 10 segundos de exposición.	81
Figura 39. <i>Skeletonema costatum</i> sometida a dosis ultrasónica de 23 Khz de frecuencia, 34.291 W/m ² de intensidad y 10 segundos de exposición.	82
Figura 40. Fenómeno de la cavitación acústica (Dehghani y Changani, 2006).....	82
Figura 41. Burbujas de cavitación acústica (Phillips at al., 1998).....	83
Figura 42. Representación esquemática de la formación de radicales libres y agua oxigenada en burbujas de cavitación acústica (González-García <i>et al.</i> , 2010).....	83
Figura 43. Nivel de presión del sonido en función de la frecuencia (Hao <i>et al.</i> , 2004)..	84

1.- INTRODUCCIÓN

Una de las características de la industria salmonicultora chilena ha sido el constante incremento en sus niveles de producción, llegando a las 500 Ton anuales el año 2008 (Fig. 1) previo a la crisis sanitaria causada por la Anemia Infecciosa del Salmón (ISAv) cuadro que diezmó a la población nacional de salares (*Salmo salar*) y puso en duda la continuidad comercial de la principales empresas del rubro (Servicio Nacional de Pesca, 2012). Superado este difícil escenario, e impulsados por un interesante precio de mercado, los productores nacionales han proyectado alcanzar 1.000 Ton anuales para el año 2014. Uno de los problemas asociados al aumento de biomasa en las zonas aptas para el cultivo de salmón, es la ocurrencia de floraciones algales nocivas (FAN), eventos que producen importantes pérdidas económicas al sector. Las FAN han acompañado a la industria desde sus inicios, sin embargo, a contar del año 2008 las empresas nacionales no cuentan con la cobertura de seguros de biomasa a causa de las altas primas decretadas por las entidades aseguradoras producto del elevado índice de riesgo del rubro salmonicultor chileno impuesto tras la debacle sanitaria y económica de los años 2008 y 2009.

Actualmente no existe ningún método eficiente para el control y erradicación de FAN a nivel mundial. En territorio nacional, se ha implementado un programa de monitoreo de fitoplancton (PROMOFI) para las empresas asociadas al Instituto Tecnológico del Salmón (INTESAL), el cual permite sólo identificar las zonas de riesgo con un margen muy reducido de tiempo.

En base a los antecedentes expuestos, se plantea la hipótesis de utilizar el ultrasonido como herramienta eficaz de control para las floraciones algales nocivas que afectan a la salmonicultura. Mediante el uso del método científico, el presente trabajo desarrollará una técnica analítica en laboratorio que permita dilucidar esta interrogante.

1.1- Aspectos generales de las floraciones algales nocivas

Las proliferaciones algales nocivas (FANs) son eventos naturales causados por organismos fitoplanctónicos, que en condiciones ambientales favorables para su desarrollo (intensidad de luz, temperatura, disponibilidad de nutrientes, condición del viento, corrientes de marea y estratificación de la columna de agua), se multiplican exponencialmente concentrándose en determinadas localidades (Anderson, 2009) (Fig. 2).

Actualmente se conocen más de 135 especies fitoplanctónicas que pueden dar lugar a FANs causando importantes impactos en el medio ambiente, la acuicultura y el turismo (Assadi *et al.*, 2007). Entre sus efectos negativos destacan las intoxicaciones en seres humanos por consumo de vertebrados e invertebrados marinos con presencia de biotoxinas, la muerte masiva de organismos marinos incluidos los provenientes de cultivo (Fig. 3) y el deterioro de la calidad de las aguas. Sus impactos económicos son de gran magnitud, alcanzando un costo promedio anual de 49 millones de dólares en Estados Unidos (Anderson *et al.*, 2000).

Uno de los aspectos que ha contribuido al aumento del número y frecuencia de eventos FANs a nivel global (Fig. 4), obedece al incremento de la eutroficación costera derivada de las actividades antropogénicas, entre las cuales se encuentran los cultivos marinos (Hallegraeff, 1993). Elementos esenciales para la replicación celular del fitoplancton como el nitrógeno y el fósforo, son aportados en gran medida, por la degradación metabólica de los piensos formulados para actividades de cultivo intensivo (Folke *et al.*, 1994).

Se han registrado más de 80 especies fitoplanctónicas causantes de muerte de organismos marinos, entre las que se destacan por su letalidad, dinoflagelados, diatomeas y rafiidofitas. Estos grupos tienen mecanismos de acción simples o combinados, que generan daños físicos o irritaciones de las branquias, reacciones toxigénicas a agentes ictiotóxicos e hipoxia en la sangre por falta de oxígeno en el ambiente (Rensel y Whyte, 2003).

En la literatura científica, existen más de 372 registros de muerte de organismos marinos causados por FANs, sin embargo, no todos han sido valorados económicamente, ergo, su real impacto en la cadena de valor de las actividades comerciales relacionadas ha sido subestimado (Assadi *et al.*, 2007).

1.2- Principales especies y formas de acción

1.2.1.- Dinoflagelados

Los dinoflagelados son un extenso grupo de protistas flagelados. Sus poblaciones se distribuyen en función de la temperatura, salinidad y profundidad. Alrededor de la mitad son fotosintéticos participando como principal constituyente de la producción primaria en las cadenas tróficas oceánicas superados en este sentido únicamente por las diatomeas. Su rasgo más característico es la presencia de dos flagelos disímiles (Fig.5) que le proporcionan unos movimientos característicos (Tomas, 1996). Otra de las peculiaridades de los dinoflagelados es la producción de poderosas sustancias tóxicas que desde el punto de vista del interés humano, pueden ser clasificadas en dos grandes grupos: las llamadas ictiotoxinas, que ejercen su acción nociva sobre peces e invertebrados (animales poiquiloterms) y las que causan trastornos y muertes en animales homeotermos (Sar *et al.*, 2002). *Alexandrium catenella* es una de las especies representante de los dinoflagelados más estudiada debido a su influencia en salud humana por medio de la síntesis del veneno paralizante del marisco (VMP) (Sar *et al.*, 2002). En sistemas acuícolas ligados a la producción intensiva de salmónidos el impacto de los dinoflagelados no es menor ya que se registran mortalidades masivas a concentraciones $> 500 \text{ cel ml}^{-1}$ con pérdidas económicas asociadas de US\$ 20.000.000 (Clement, 2003).

1.2.2.- Diatomeas

Las diatomeas son una clase de algas microscópicas conocidas también como Bacillariophyceae. La mayoría son unicelulares, aunque algunas de ellas pueden existir como colonias en forma de filamentos, abanicos o estrelladas. Por sus características y requerimientos se las consideran las únicas algas verdaderas ya que no presentan ninguna estructura propia del reino animal. Poseen el mayor número de especies (aproximadamente unas 500.000) teniendo una amplia distribución mundial y conformando el grupo más importante del fitoplancton debido a que aportan cerca del 90% de la productividad primaria de los ecosistemas marinos (Tomas, 1996).

La totalidad de la diatomeas son de naturaleza fotosintética presentado en sus cloroplastos clorofila a y c, beta-caroteno y xantofilas, los cuales le confieren una coloración pardo-dorada. Todas las diatomeas almacenan sus reservas como crisolaminaria o leucocina (carbohidrato) y aceites (Cupp, 1943).

Una característica distintiva de las diatomeas es la presencia de una pared externa de dióxido de silicio hidratado llamado valvas o frústulo (Cupp, 1943) (Fig. 6 *Alfa* y *Beta*).

Dentro del grupo de las diatomeas *Chaetoceros convolutus*, *Rhizosolenia setigera* y *Skeletonema costatum* destacan como uno de los agentes causantes de FANs con mayor letalidad, debido a que provocan la muerte de salmónidos por asfixia a bajas concentraciones celulares ($> 5 \text{ cel ml}^{-1}$, $> 500 \text{ cel ml}^{-1}$, $> 40.000 \text{ cel ml}^{-1}$, respectivamente) (Assadi *et al.*, 2007). Entre 1982 y 1987 EE.UU. reportó la pérdida de 600 toneladas de ejemplares de *Salmo salar* valorados en US\$ 17.500.000, como consecuencia de sus floraciones (Bruslé, 1995).

1.2.3.- Rafidoficeas

Las rafidoficeas se encuentran entre los flagelados desnudos conocidos de mayor tamaño, con tallas que oscilan normalmente entre 15 y 100 μm de largo. Las células nadan mediante movimientos de un flagelo anterior, que describe una trayectoria sinusoidal. El segundo flagelo, a veces difícil de ver, está orientado hacia la parte posterior y se sitúa generalmente a lo largo de, y próximo a, la superficie celular. En

algunas especies el segundo flagelo es corto y liso (Fig. 7). A diferencia de casi todos los otros flagelados marinos heterokontas, las células de las rafdofíceas contienen varios, o muchos cloroplastos diseminados en la parte externa de la célula. Su característico color amarillo o amarillo-pardo se atribuye a la presencia del carotenoide fucoxantina en los cloroplastos, además de las clorofilas verdes *a* y *c*. El número de especies comprendidas en la clase Raphidophyceae es muy reducido. En el medio marino se encuentran alrededor de veinte especies, la mayoría de las cuales, sino todas, son nocivas para los peces, ya que dañan el epitelio de sus branquias produciéndoles la muerte (Avaria *et al.*, 1999). *Heterosigma akashiwo* es uno de los ejemplares integrantes de las rafdofitas más temidos en la salmonicultura a nivel mundial. Entre 1986 y 1997 se registraron pérdidas en Japón, Canadá y Nueva Zelanda por cifras que bordearon los U\$ 43.000.000 (Assadi *et al.*, 2007). Situación similar se reportó el año 2006 en la zona norte de EE.UU., donde las granjas acuícolas productoras de salmónidos tuvieron pérdidas valoradas en U\$2.000.000 a causa de sus floraciones (Rensel, 2007). En la décima región de los lagos de Chile, se han informado desde el año 1988 mortalidades superiores a las 2.000 Ton de *Salmo salar* principalmente en la zona de Hornopirén, Seno de Reloncaví y mar interior de Chiloé (Fuica *et al.*, 2007).

1.3- Estrategias de mitigación

Con el objetivo de reducir las pérdidas económicas causadas por FANs se han desarrollado diferentes estrategias de mitigación, empleadas en distintas zonas del mundo, las cuales han sido orientadas principalmente a cultivo de peces. Entre las más utilizadas se pueden mencionar: disminución temporal de la alimentación, aeración, bombeo de agua profunda (Rensel, 1995), desplazamiento de jaulas (Rensel y Whyte, 2003), diseminación de materiales arcillosos (Anderson *et al.*, 2001) y extracción anticipada de la producción (Assadi *et al.*, 2007). Si bien estas técnicas han resultado ser efectivas, requieren de una logística compleja lo que se traduce en lentas capacidades de respuesta e importantes desembolsos de divisas.

1.4- Sustitutos de prueba

El uso de sustitutos de prueba fue desarrollado exitosamente por Larson y Mariñas (2003) en sus ensayos de inactivación de esporas. Se conoce como modelo biológico o sustituto de pruebas a un organismo específico que es estudiado ampliamente con el objeto de generar datos que puedan ser aplicados a otros individuos de interés sobre los cuales desde el punto de vista técnico o ético resulta complejo trabajar. La rata de laboratorio, es un ejemplo clásico de las especies utilizadas con dicho fin. Este roedor, es analizado con el objetivo de aprender más sobre la naturaleza de los mamíferos, sin la necesidad de experimentar directamente en seres humanos. Los sustitutos de pruebas son seleccionados entre otras razones por las similitudes genéticas entre ellos y los seres vivos de los cuales deseamos obtener información, facilidad de manipulación, disponibilidad y bajo costo (Liescheke y Currie, 2007). *Chaetoceros muellerii* y *Nitzschia* sp. son especies que constituyen un buen sustituto de pruebas para las diatomeas *Chaetoceros convolutus* y *Rhizosolenia setigera* respectivamente debido a su facilidad de cultivo en condiciones de laboratorio y disponibilidad, al ser fitoplacton marino muy utilizado en criaderos de moluscos mientras que *Alexandrium* sp. suele ser utilizada en reemplazo de *Alexandrium catenella* por su semejanza taxonómica y similitud estructural (Godínez *et al.*, 2003).

2.- ANTECEDENTES

2.1- Aspectos generales del sonido

Podemos definir el sonido como una sensación auditiva producida por la vibración de algún objeto. Estas vibraciones, conocidas como ondas, son captadas por nuestro oído y transformadas en impulsos nerviosos que se derivan al cerebro para su interpretación (Alonso y Finn, 1987) (Fig.8). La rama de la física especializada en el estudio del sonido se denomina acústica. Esta ciencia, define una onda como la propagación de una perturbación de alguna propiedad de un medio, por ejemplo, densidad, presión, campo eléctrico o campo magnético, que se mueve a través del espacio transportando energía. El medio perturbado puede ser de naturaleza diversa como aire, agua, un trozo de metal o el vacío (Serway, 1997).

Las ondas sonoras poseen dos características relacionadas con su percepción. El “tono acústico” que corresponde desde el punto de la física a la frecuencia (f) y la “intensidad sonora” relacionada con la amplitud de onda (\mathcal{Y}) (Fig. 9).

2.1.1.- Frecuencia

La frecuencia (f) es una magnitud que mide el número de repeticiones por unidad de tiempo de cualquier fenómeno o suceso periódico. Para calcular la frecuencia de un suceso, se contabiliza el número de ocurrencias de este teniendo en cuenta un intervalo temporal, luego las repeticiones se dividen por el tiempo transcurrido. Según el sistema internacional (SI), la frecuencia se mide en hercios (Hz), en honor a Heinrich Rudolf Hertz. Un hercio es aquel suceso o fenómeno repetido una vez por segundo, dos hercios son dos sucesos por segundo, etc. (ec.1). De esta forma los tonos agudos son aquellos asociados a elevados valores de hercios mientras que sonidos graves se relacionan con bajas frecuencias (Fig.10)

$$1\text{Hz} = \frac{1}{\text{s}} \quad \text{ec.1 (Serway, 1997)}$$

Un método alternativo para calcular la frecuencia es medir el tiempo entre dos repeticiones y luego aplicar la ec.2:

$$f = \frac{1}{T} \quad \text{ec.2 (Serway, 1997)}$$

El periodo (T) es el tiempo medido en segundos, que tarda la onda en ir desde un punto de máxima o mínima amplitud al siguiente (Fig.11).

La frecuencia tiene una relación inversa con el concepto de longitud de onda, a mayor frecuencia menor longitud de onda y viceversa. La frecuencia f (medida en Hz) es igual a la velocidad v de la onda (m/s), dividido por la longitud de onda (λ) cuantificada en metros:

$$f = \frac{v}{\lambda} \quad \text{ec.3 (Serway, 1997)}$$

La longitud de onda corresponde a la distancia que existe entre dos montes o valles seguidos (Fig. 9). Definimos como monte al punto más alto de una onda mientras que a su contraparte se le denomina valle (Fig.11).

La velocidad del sonido en los océanos (v) fue descrita por Mackenzie (1981) (ec. 4).

$$v(T, S, Z) = a_1 + a_2T + a_3T^2 + a_4T^3 + a_5(S - 35) + a_6Z + a_7Z^2 + a_8T(S - 35) + a_9TZ^3 \quad (\text{ec.4})$$

Donde T , S , y Z son los valores *in situ* de la temperatura medidos en grados centígrados, la salinidad en partes por mil y la profundidad en metros, respectivamente. Las magnitudes de las constantes a_n , corresponde a:

$$a_1 = 1448,96, \quad a_2 = 4,591, \quad a_3 = -5,304 \times 10^{-2}, \quad a_4 = 2,374 \times 10^{-4}, \quad a_5 = 1,340, \quad a_6 = 1,630 \times 10^{-2}$$

$$a_7 = 1,675 \times 10^{-7}, \quad a_8 = -1,025 \times 10^{-2}, \quad a_9 = -7,139 \times 10^{-13}$$

2.1.2.- Intensidad

La intensidad es otra cualidad de las ondas acústicas a través de la cual se pueden distinguir los sonidos suaves y fuertes. Desde el punto de vista de la física, este fenómeno se relaciona con la amplitud (Y) que corresponde a la distancia vertical entre un monte y el punto medio de una onda (Fig.9). Es así como en sonidos débiles, la amplitud de onda presenta bajos valores mientras que en sonoridades intensas sus magnitudes son elevadas (Fig.12). Matemáticamente la intensidad del sonido se define como la potencia acústica transferida por una onda sonora dividida por el área normal a la dirección de su propagación. Se entiende por potencia acústica a la cantidad de energía por unidad de tiempo emitida por una fuente determinada en forma de ondas sonoras (Alonso y Finn, 1987) (ec.5)

$$I = \frac{P}{A} \quad (\text{ec.5}) \quad (\text{Alonso y Finn, 1987})$$

Donde I (W/m^2) es la intensidad de sonido, P es la potencia acústica medida en Watts y A es el área normal a la dirección de propagación cuantificada en metros cuadrados.

Una onda esférica, es aquella oscilación tridimensional que se propaga a la misma velocidad en todas direcciones. Se le asignó este nombre debido a que sus frentes de ondas son esferas concéntricas, cuyos centros coinciden con la posición de la fuente de perturbación (Marín, 2009) (Fig. 13).

Las ondas sonoras son clasificadas como esféricas cuando se propagan a través de un medio homogéneo e isotrópico como el agua en reposo. Para una onda esférica cada frente de onda es una esfera de radio r . En este caso, la intensidad acústica en un punto específico, se obtiene al reemplazar el área transversal a la potencia por la función que

describe a la superficie de una esfera de radio correspondiente a la distancia existente entre la fuente de perturbación y el punto de interés (Alonso y Finn, 1987) (ec.6)

$$I = \frac{P}{A} = \frac{P}{4\pi r^2} \quad \text{ec.6 (Alonso y Finn, 1987)}$$

El oído humano tiene la capacidad de escuchar sonidos a partir de una intensidad de 10^{-12} W/m². Esta intensidad se conoce como umbral de audición. Cuando la intensidad supera 1 W/m², la sensación se vuelve dolorosa. Dado que en el rango de intensidades que nuestro sistema auditivo puede detectar sin dolor hay grandes diferencias en el número de cifras empleadas en una escala lineal, es habitual utilizar una escala logarítmica. Por convención, en dicha escala logarítmica se emplea como nivel de referencia el umbral de audición. La unidad más empleada en la escala logarítmica es el decibelio (dB) (Alonso y Finn, 1987) (ec.7).

$$I_{dB} = 10 \log_{10} \frac{I}{I_0} \quad \text{ec.7 (Alonso y Finn, 1987)}$$

Donde I_{dB} es la intensidad acústica en decibelios, I es la intensidad acústica en la escala lineal (W/m² en el SI) e I_0 es el umbral del audición (10^{-12} W/m²). En esta nueva escala 0 dB corresponde a la mínima sonoridad que podemos percibir mientras que en magnitudes mayores a 120 dB la sensación se torna dolorosa (Alonso y Finn, 1987).

El nivel de presión sonora o SPL por sus siglas en inglés (Sound Pressure Level) determina la intensidad del sonido que genera una presión sonora instantánea en relación con la presión atmosférica (Alonso y Finn, 1987). El Pascal en la unidad más utilizada para medir presión, sin embargo, para el caso de la presión sonora resulta poco práctico

debido al amplio margen que existe entre la presión sonora más intensa (200 Pa) y la más débil (20 μPa) que capta el oído humano. Como el decibelio es adimensional y relativo, constituye una herramienta amigable para su medición. Matemáticamente SPL se define como:

$$SPL_{dB} = 20 \log_{10} \frac{P}{P_0} \quad \text{ec.8 (Yan et al., 2010)}$$

Donde P es la presión del sonido medida en el punto de interés (μPa) y P_0 la presión de referencia correspondiente al umbral de audición (μPa). Resulta importante señalar que para medios aéreos $P_0 = 20 \mu\text{Pa}$ mientras que para ambientes submarinos $P_0 = 1 \mu\text{Pa}$. De esta forma el umbral de audición queda definido por 0dB y la zona del dolor se registra partir de 140 dB en el aire (Yan et al., 2010).

Con la finalidad de evitar confusiones con respecto a la naturaleza de la presión de referencia, se ha convenido citarla junto a la magnitud de los decibeles. De esta forma, $SPL = 5 \text{ dB re } 1 \mu\text{Pa}$ significa que el nivel de presión sonora en un punto corresponde a 5 decibeles teniendo como presión de referencia $1 \mu\text{Pa}$ (Yan et al., 2010). Algunas relaciones de magnitudes bajo el agua son expuestas en la Figura 14.

2.2- Aspectos generales del ultrasonido

Entendemos por ultrasonido todas aquellas ondas sonoras cuyas frecuencias superan el intervalo audible humano. En términos cuantitativos nos situamos sobre los 20.000 Hz (Alonso y Finn ,1987) (Fig. 15). La ultrasónica tiene variados usos en diferentes campos de la física, química, tecnología y medicina. Dentro de las

aplicaciones más conocidas podemos mencionar: determinación de propiedades de la materia como la compresibilidad o la elasticidad, producción de emulsiones como la leche homogeneizada o las películas fotográficas, detección de fallas estructurales en materiales industriales, tratamientos kinesiológicos para diferentes tipos de lesiones y ecografías (Alonso y Finn ,1987).

El desarrollo de la acústica submarina tuvo su mayor progreso durante la segunda guerra mundial debido a la necesidad de neutralizar la irrupción de los submarinos al escenario bélico. El resultado de toda la investigación científica, se materializó en la creación del sonar, instrumento que sigue vigente en la actualidad gracias a que la pesquería industrial lo incorporó como herramienta localizadora de cardúmenes en alta mar (Moreno,1990).

2.2.1.- Aplicaciones en acuicultura

En acuicultura, la aplicación del sonido se ha limitado al uso del ecosonda como instrumento para determinar profundidades y perfiles de fondo en las concesiones marinas, con la finalidad de diseñar las estructuras de fondeo para las distintas artes de cultivo, sin embargo, las frecuencias ultrasónicas no son utilizadas regularmente para dicho efecto debido a que recorren cortas distancias (Moreno, 1990).

La salmonicultura chilena ha incorporado recientemente la combinación de diferentes tratamientos ultrasónicos como estrategia de control para *Otaria flavescens* (lobo marino), especie que ha causado importantes pérdidas de biomasa en la industria nacional (Vergara ,2010).

Como norma general, los peces teleostos presentan un amplio intervalo auditivo que va desde 1 Hz a 1.100 Hz motivo por el cual los tratamientos ultrasónicos no provocarían efectos indeseados a las especies que conforman este grupo, al situarse dichas frecuencias muy lejos del límite superior de su banda auditiva (Popper y Ketten ,2008) (Fig.16). Para el caso de los salmónidos, el umbral de audición está situado entre los 30

Hz y 400 Hz presentando su máxima sensibilidad en los 150 Hz (Hawkins y Johnstone, 1978) (Fig. 17).

En lo referido al uso del ultrasonido en fitoplancton, resulta importante señalar que técnicas ultrasónicas han sido utilizadas con éxito en laboratorio y escala piloto, como método eficaz para controlar la proliferación de la microalga nociva *Microcystis aeruginosa* en el lago Taihu, el cual representa la tercera zona lacustre más grande de China en términos de superficie e importante fuente de agua potable para la población de esta nación oriental (Zhang *et al.*, 2009) (Fig. 18 y Fig. 19). A la fecha complementan esta publicación 28 trabajos científicos de los cuales 24 hacen referencia al efecto del ultrasonido en el grupo de las cianobacterias, 2 se enfocan en algas verdes y los restantes están orientados hacia las diatomeas (Purcell, 2009) (Fig. 20). Dentro de los principales efectos causados por las ondas ultrasónicas a nivel celular se mencionan la ruptura de vacuolas de gas en cianobacterias, daños en la estructura de los cloroplastos en algas verdes y lesiones en las membranas plasmáticas de diatomeas. No existen publicaciones basadas en el efecto sobre los dinoflagelados y rafidofitas.

Krivograd y Griessler- Bule (2010) publicaron el primer artículo científico que trata sobre los positivos efectos del ultrasonido como método de control de fitoplancton en sistemas cerrados de cultivo de la carpa común europea, reportando una disminución del 71% en la abundancia de especies planctónicas sin efectos negativos en los indicadores productivos del recurso *Cyprinus carpio*.

3.- HIPÓTESIS

El ultrasonido tiene un efecto negativo en la viabilidad de las floraciones algales nocivas que afectan a la salmonicultura.

4.- OBJETIVOS

4.1. - Objetivo General

Determinar el efecto del ultrasonido en la viabilidad de *Alexandrium* sp, *Chaetoceros muellerii*, *Heterosigma akashiwo*, *Nitzschia* sp. y *Skeletonema costatum* con la finalidad de cuantificar parámetros de diseño óptimos (intensidad y tiempo de exposición) que permitan elaborar una estrategia de control para sus floraciones nocivas en salmonicultura.

4.2. - Objetivos Específicos

- Comparar el efecto de la intensidad de onda ultrasónica (11.430, 18.288, 22.861, 29.719 y 34.291 W/m²) en la viabilidad de *Alexandrium* sp, *Chaetoceros muellerii*, *Heterosigma akashiwo*, *Nitzschia* sp. y *Skeletonema costatum*.
- Determinar el efecto de tiempos de exposición (10, 20, 30, 40 y 50 segundos) a una onda ultrasónica de baja intensidad (11.430 W/m²) en la viabilidad de *Alexandrium* sp, *Chaetoceros muellerii*, *Heterosigma akashiwo*, *Nitzschia* sp. y *Skeletonema costatum* .

5.- MATERIALES Y MÉTODO

5.1.- Selección de Cepas

Fueron seleccionadas cinco especies de fitoplancton que a nivel nacional han generado las mayores pérdidas económicas a la industria salmonicultora (Tabla 1). Debido a la imposibilidad administrativa de trasladar cepas potencialmente peligrosas entre regiones del país, decretada por el Servicio Nacional de Pesca (SERNAP) a través del reglamento de plagas (REPLA), se optó por utilizar los sustitutos de pruebas (Tabla 1) existentes en el Laboratorio de Producción Primaria (L.P.P.) de la Universidad Católica del Norte (U.C.N.), ubicado en la bahía de La Herradura, región de Coquimbo, Chile y en el Centro Regional de Análisis de Recursos y Medio Ambiente (CERAM) de la Universidad Austral de Chile, situado en la ciudad de Puerto Montt, región de los Lagos, Chile.

La fase experimental fue desarrollada íntegramente en dependencias del L.P.P. de la UCN, a razón que esta casa de estudios proporcionó la totalidad los espacios físicos, equipamientos y reactivos para la realización del presente trabajo.

5.2.- Determinación de la Viabilidad Celular

Para cuantificar la viabilidad de las cepas seleccionadas una vez sometidas a los tratamientos de potencia y tiempo de exposición a ondas ultrasónicas, se utilizó el indicador denominado “Porcentaje de Viabilidad” (ec.9). Este algoritmo, permitió medir en forma indirecta el daño celular relativo causado a las microalgas por la aplicación de las técnicas experimentales empleadas.

$$Pv = \frac{bc}{bt} \times 10^2 \quad \text{ec.9} \quad \text{Modificado de Cañavate y Lubinn (1995).}$$

Donde:

Pv = Porcentaje de viabilidad (%).

bc = Pendiente de una curva de crecimiento obtenida post tratamiento.

bt = Pendiente de una curva de crecimiento estándar (sin tratamiento).

5.3.- Obtención de las Curvas de Crecimiento Estándar

Las curvas de crecimiento estándar para *Alexandrium sp*, *Chaetoceros muellerii*, *Heterosigma akashiwo*, *Nitzschia sp.* y *Skeletonema costatum* fueron obtenidas inoculando 500.000 cel ml⁻¹ de cada especie en tres tubos de ensayo provistos con 10 ml de medio nutritivo f/2 modificado (Tabla 2). Cada tubo fue tapado y sometido a condiciones constantes de luz (3.500 ± 100 Lux) y temperatura (20 ± 1 °C) durante una semana (Purcell, 2009) (Fig.21). Con la finalidad de obtener curvas de crecimiento en la fase exponencial de replicación celular, diariamente y hasta completar un número de siete mediciones, la cantidad de cel ml⁻¹ existente en cada tubo se cuantificó mediante la observación en microscopio óptico marca Nikon, modelo ELWD 0,3. Para determinar la densidad celular, se extrajo una alícuota (1 ml) de cada tubo, la que fue puesta sobre una cápsula de Neubauer previa fijación con lugol (Fig. 22).

5.3.1- Cálculo de la pendiente de una curva de crecimiento estándar (bt)

Utilizando el promedio de la concentración celular como variable dependiente y el tiempo en que ella fue medida como variable independiente, se realizó una regresión geométrica de la forma indicada en la ecuación 10. Resulta importante señalar que dicha función fue validada únicamente en la fase exponencial de la división celular para cada cepa.

$$y = ax^b \quad \text{ec. 10} \quad \text{Cerdea (1997).}$$

Donde:

y = Densidad de la cepa utilizada expresada en cel ml⁻¹.

x = Tiempo transcurrido post inoculación expresado en horas.

b = bt = Pendiente de la curva de crecimiento.

a = Coeficiente de posición.

La caracterización de la fase exponencial del crecimiento celular fue realizada mediante la metodología propuesta por Renaud y colaboradores en el año 1999 (ec.11)

$$\mu = \frac{\ln\left[\frac{Nt}{No}\right]}{[t-t_0]} \quad \text{ec.11} \quad (\text{Renaud } et \text{ al., 1999}).$$

Donde:

No = Densidad celular en el tiempo inicial expresada en cel ml⁻¹.

Nt = Densidad celular en el tiempo final expresada en cel ml⁻¹.

t_0 = Tiempo inicial expresado en días.

t = Tiempo final expresado en días.

μ = Tasa de crecimiento celular (su valor es constante en la fase exponencial de una curva de crecimiento).

5.4.- Intensidad de onda ultrasónica

Para determinar el efecto de diferentes intensidades de onda ultrasónica sobre la viabilidad celular de *Alexandrium sp*, *Chaetoceros muellerii*, *Heterosigma akashiwo*, *Nitzschia sp.* y *Skeletonema costatum*, se montó un transductor marca SonifierTM

modelo 150 dentro de una probeta de vidrio de 100 ml y base circular de 4,34 cm². Con el apoyo de un soporte universal fue posible ubicar el estremo posterior del transductor a 4 cm del fondo de la probeta (Fig. 23). Previamente se dispuso de 200 ml de cultivo madre para cada cepa en estudio los cuales fueron preparados a una concentración de 500.000 cel ml⁻¹ en medio nutritivo f/2 modificado (Fig. 24).

Mediante la manipulación de la unidad central de proceso del equipo de ultrasonido, fue posible seleccionar cinco potencias de salida (5,8, 10,13 y 15 watt) para el transductor a una frecuencia fija de 23.000 Hz. Las intensidades sónicas (11.430, 18.288, 22.861, 29.719 y 34.291 W/m²) fueron obtenidas al dividir las respectivas potencias de salida por el área del reactor utilizado (4,34 cm²) (ec.6).

La probeta de ensayo acondicionada con el transductor, fue llenada en cada oportunidad con 35 ml de cultivo madre y por un lapso de 10 segundos fue sometida a las potencias de salida y frecuencia definidas con antelación. Posterior a cada tratamiento y previa homogenización, se tomaron 30 ml de solución resultante las que fueron inoculadas en tres tubos de ensayo de 10 ml. Cada tubo fue tapado y sometido a condiciones constantes de luz (3.500 ± 100 Lux) y temperatura (20 ± 1 °C) durante una semana. Diariamente y hasta completar un número de siete mediciones, la cantidad de cel ml⁻¹ existente en cada uno de ellos se cuantificó mediante la observación en microscopio óptico. Para determinar la densidad celular, se extrajo una alícuota (1 ml) de cada tubo, la que fue puesta sobre una cápsula de Neubauer previa fijación con lugol.

Una vez obtenida la pendiente “bc” de la curva de crecimiento para cada ensayo y cepa (ec.10 y ec 11), fue posible determinar sus respectivos porcentajes de viabilidad (ec.9). De esta forma, se obtuvo una matriz de pares ordenados que permitió relacionar la potencia de salida del transductor con el porcentaje de viabilidad celular para cepa en estudio.

Utilizando los valores de potencia de salida como variable independiente y el porcentaje de viabilidad como variable dependiente se realizó una regresión lineal de la forma:

$$Pv = a + bI \text{ ec.12 (Sokal y Rohlf, 1984)}$$

Donde:

Pv = Porcentaje de viabilidad (%).

I = Intensidad de onda acústica expresada en (W/m^2).

b = Pendiente de la curva.

a = Coeficiente de posición.

La validez estadística de la pendiente “ b ” así como los límites de confianza para cada valor de “ Pv ” fueron determinados en cada cepa según Scheffler (1981).

Para señalar la existencia de diferencias estadísticas y grupos homogéneos entre las curvas obtenidas para cada grupo de microalgas, se realizó un test de ANCOVA y Tukey respectivamente, previa corrección de las cifras expresadas en porcentajes mediante la aplicación de la función trigonométrica arco seno de raíz cuadrada (Zar, 1999). Los test estadísticos ANCOVA y Tukey fueron trabajados con el programa STATISTICA.

5.5.- Tiempo de exposición a ultrasonido

Para determinar el efecto del tiempo de exposición a ultrasonido sobre la viabilidad celular de *Alexandrium sp*, *Chaetoceros muellerii*, *Heterosigma akashiwo*, *Nitzschia sp.* y *Skeletonema costatum*, se montó un transductor marca SonifierTM modelo 150 dentro de una probeta de vidrio de 100 ml y base circular de 4,34 cm². Con el apoyo de un soporte universal fue posible ubicar el extremo posterior del transductor a 4 cm del fondo de la probeta.

Previamente se dispuso de 200 ml de cultivo madre para cada cepa en estudio los cuales fueron preparados a una concentración de 500.000 cel ml⁻¹ en medio nutritivo f/2 modificado.

Mediante la manipulación de la unidad central de proceso del equipo de ultrasonido, fue posible seleccionar cinco intervalos de tiempo (10, 20, 30, 40 y 50 segundos) para el funcionamiento del transductor a una frecuencia fija de 23.000 Hz y una potencia de

salida de 5 watt. La intensidad sónica (11.430 W/m^2) fue obtenida al dividir la potencia de salida (5 watt) por el área del reactor utilizado ($4,34 \text{ cm}^2$) (ec.6).

La probeta de ensayo acondicionada con el transductor fue llenada en cada oportunidad con 35 ml de cada cultivo madre y sometida a los tiempos de exposición, potencia de salida y frecuencia definidas con antelación. Posterior a cada tratamiento y previa homogenización, se tomaron 30 ml de solución resultante los que fueron inoculadas en tres tubos de ensayo de 10 ml. Cada tubo fue tapado y sometido a condiciones constantes de luz ($3.500 \pm 100 \text{ Lux}$) y temperatura ($20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) durante una semana.

Diariamente y hasta completar un número de siete mediciones, la cantidad de cel ml^{-1} existente en cada uno de ellos se cuantificó mediante la observación en microscopio óptico. Para determinar la densidad celular, se extrajo una alícuota (1 ml) de cada tubo, la que fue puesta sobre una cápsula de Neubauer previa fijación con lugol.

Una vez obtenida la pendiente “*bt*” de la curva de crecimiento para cada ensayo y cepa (ec.10 y ec.11), fue posible determinar sus respectivos porcentajes de viabilidad (ec.9). De esta forma, se obtuvo una matriz de pares ordenados que permitió relacionar el tiempo de exposición a una onda acústica ultrasónica con el porcentaje de viabilidad celular para cada cepa en estudio.

Utilizando los valores de tiempo de exposición como variable independiente y el porcentaje de viabilidad como variable dependiente se realizó una regresión lineal (ec.12) según lo indicado en la sección 5.4.

La validez estadística de la pendiente “*bt*” así como los límites de confianza para cada valor de “*Pv*” fueron determinados en cada cepa según Scheffler (1981).

Para señalar la existencia de diferencias estadísticas y grupos homogéneos entre las curvas obtenidas para cada grupo de microalgas, se realizó un test de ANCOVA y Tukey respectivamente, previa corrección de las cifras expresadas en porcentajes mediante la aplicación de la función trigonométrica arco seno de raíz cuadrada (Zar, 1999). Los test estadísticos ANCOVA y Tukey fueron trabajados con el programa STATISTICA.

6. – RESULTADOS

6.1.- Intensidad de onda ultrasónica

6.1.1- Curvas de crecimiento

Dentro de las curvas de crecimiento obtenidas para el grupo de las diatomeas, las cepas *Nitzschia* sp. (Fig.25), *Chaetoceros muellerii* (Fig.26) y *Skeletonema costatum* (Fig.27) mostraron un patrón común donde fue posible observar claramente el efecto del tratamiento de menor intensidad sónica (11.430 W/m^2) sobre el desempeño de la división celular con respecto a las curvas patrón y los restantes tratamientos. A partir de la segunda intensidad en orden creciente (18.288 W/m^2) prácticamente no se observaron diferencias importantes entre los crecimientos poblacionales. Cabe señalar la evidente correspondencia entre el aumento de la intensidad del sonido con la disminución en el número poblacional a iguales tiempos de cultivo post tratamientos.

En el caso de la rafidófita *Heterosigma akashiwo* no se observó un efecto intermedio asociado al tratamiento de 11.430 W/m^2 concentrándose todas las curvas de crecimiento en una zona relativamente acotada a excepción de la curva patrón que mostró un desempeño notablemente superior al resto (Fig.28). Finalmente para el dinoflagelado *Alexandrium* sp (Fig. 29) fue posible observar un comportamiento similar al anteriormente descrito en las diatomeas tanto en la diferenciación del evento de menor intensidad sónica con los restantes y la curva patrón así como en la correspondencia entre el aumento de la intensidad del sonido con la disminución en el número poblacional a iguales tiempos de cultivo post tratamientos.

Los valores “b” (ec.10) de las pendientes asociadas a las curvas de crecimiento para las figuras 25, 26, 27, 28 y 29 son detallados en la Tabla 3. Como norma general, se observaron altos grados de asociación entre el tiempo transcurrido post inoculación y la concentración celular en todas las cepas ya que el promedio de los coeficientes de

determinación (r^2) fue superior a 85% en cada una de las regresiones geométricas calculadas. De esta forma, más de cuatro quintiles de los datos experimentales fueron representados por las curvas de regresión, confirmando a la ecuación 10 como buena predictora para las curvas de crecimiento en fase exponencial.

6.1.2- Porcentajes de viabilidad

Los porcentajes de viabilidad (P_v) obtenidos a partir de la ecuación 9 y su correspondencia con las cepas e intensidad del sonido son detallados en la Tabla 4. Como norma general se observó que un aumento de la intensidad del sonido se relacionó con una disminución en la viabilidad celular tanto en las diatomeas como en los representantes de las rafidófitas y dinoflagelados.

6.1.3- Relación intensidad del sonido v/s porcentaje de viabilidad

La Tabla 5 muestra los coeficientes de determinación (r^2), pendientes (b) y coeficientes de posición (a) específicos para cada cepa obtenidos post aplicación de las regresiones lineales (ec. 12). Se observó un alto grado de asociación negativa (promedio $r^2 > 0,9$) entre la intensidad del sonido y la viabilidad celular, dado que un incremento en la primera variable, generó como consecuencia una disminución en la segunda (Fig. 30). De esta forma, más de cuatro quintiles de los datos experimentales fueron representados por las curvas regresión lineal, consolidando a la ecuación de Sokal y Rohlf como un buen predictor de la relación existente entre las variables y parámetros analizados. Resulta importante destacar que para lograr idénticos niveles de viabilidad celular en las distintas cepas, fue necesario incrementar la intensidad del sonido a medida que se migra desde las especies sin frústulo (dinoflagelados y rafidófitas) a las que presentan valvas (diatomeas), encontrando extremos opuestos en *Alexandrium sp* y *Nitzschia sp*. (Fig. 30).

6.1.3.1- Test de validación estadística para pendientes

Los valores calculados (t_c) y tabulados (t_t) correspondientes a la distribución “t” de Student para ensayos de validación estadística de pendientes (b) obtenidas por medio de regresiones lineales se presentan en Tabla 6. Todas las pendientes calculadas mostraron validez estadística significativa superando en a lo menos 80% sus valores críticos de aceptación. Las cifras correspondientes a las cepas *Heterosigma akashiwo* y *Skeletonema costatum* destacaron al mostrar un sólido peso estadístico respaldadas por magnitudes de “ t_c ” superior en cinco veces a sus respectivos valores críticos de aceptación.

6.1.3.2- Límites de confianza para los porcentajes de viabilidad

La ecuación 14 describe la forma general para los límites de confianza de los porcentajes de viabilidad asociados a una intensidad de sonido, mientras que la Tabla 7 muestra los valores específicos correspondientes al error estándar de los coeficientes de regresión lineal (S_b) para cada cepa en estudio. Adicionalmente en la Tabla 8 se presentan en valor absoluto, los límites de confianza para cada cepa e intensidad sónica utilizada en el diseño experimental. Como norma general, los valores mínimos (± 17) y máximos (± 50) para lo límites de confianza de las viabilidades celulares, presentaron holgadas amplitudes de rango que en la totalidad de los casos superan la décima parte de su valor medio calculado mediante análisis de regresión.

$$Pv (\%) \pm Sb \sqrt{\frac{7}{6} + \frac{(I-19.432)^2}{781.313.653}} \quad \text{ec.14}$$

Donde:

Pv = Porcentaje de viabilidad (%)

I = Intensidad del sonido (W/m^2) usada para obtener Pv .

Sb = Error estándar del coeficiente de regresión.

6.1.3.3- Análisis de covarianza (ANCOVA) para pendientes de regresión lineal

La Tabla 9 muestra los valores obtenidos para el análisis de covarianza. Se detectaron diferencias significativas entre los valores de las pendientes (b) asociadas a las regresiones lineales calculadas para cada cepa en estudio.

6.1.3.4- Test de Tukey para grupos homogéneos

La Tabla 10 muestra los resultados obtenidos para la conformación de grupos homogéneos. Se observó la presencia de tres grupos asociados a su caracterización taxonómica. La clasificación “1” reunió a las diatomeas mientras que la agrupación “2” y “3” correspondió a dinoflagelados y rafidófitas respectivamente.

6.2.- Tiempo de exposición a ultrasonido

6.2.1- Curvas de crecimiento

Dentro de las curvas de crecimiento obtenidas para el grupo de las diatomeas, las cepas *Nitzschia* sp. (Fig.31), *Chaetoceros muellerii* (Fig.32) y *Skeletonema costatum* (Fig.33) mostraron un patrón común donde fue posible observar claramente el efecto del tratamiento de menor tiempo de exposición (10 s) sobre el desempeño de la división celular con respecto a las curvas patrón y los restantes tratamientos. A partir del segundo lapso en orden creciente (20 s) prácticamente no se observaron diferencias importantes entre los crecimientos poblacionales. Cabe señalar la evidente correspondencia entre el aumento del tiempo de exposición a ultrasonido con la disminución en el número poblacional a iguales tiempos de cultivo post tratamientos.

En el caso de la rafidófita *Heterosigma akashiwo* no se observó un efecto intermedio asociado al tratamiento de 10 segundos concentrándose todas las curvas de crecimiento en una zona relativamente acotada a excepción de la curva patrón que mostró un desempeño notablemente superior al resto (Fig.34). Finalmente para el

dinoflagelado *Alexandrium sp* (Fig. 35) fue posible observar un comportamiento similar al anteriormente descrito en las diatomeas, tanto en la diferenciación del evento de menor tiempo de exposición sónica con los restantes y la curva patrón así como en la correspondencia entre el aumento del tiempo de exposición a ultrasonido con la disminución en el número poblacional a iguales tiempos de cultivo post tratamientos. Un evento notable a destacar fue la disminución del número poblacional a partir de los 30 segundos de exposición.

Los valores “*b*” (ec.10) de las pendientes asociadas a las curvas de crecimiento para las figuras 31, 32, 33, 34 y 35 son detallados en la Tabla 11. Como norma general, se observaron altos grados de asociación entre el tiempo transcurrido post inoculación y la concentración celular en todas las cepas ya que el promedio de los coeficientes de determinación (r^2) fue superior a 85% en cada una de las regresiones geométricas calculadas. De esta forma, más de cuatro quintiles de los datos experimentales fueron representados por las curvas de regresión, confirmando a la ecuación 10 como buena predictora para las curvas de crecimiento en fase exponencial.

6.2.2- Porcentajes de viabilidad

Los porcentajes de viabilidad (P_v) obtenidos a partir de la ecuación 9 y su correspondencia con las cepas y tiempo de exposición a ultrasonido son detallados en la Tabla 12. Como norma general se observó que un aumento en el tiempo de exposición se relacionó con una disminución en la viabilidad celular tanto en las diatomeas como en la representante de las rafidófitas y dinoflagelados. Las viabilidades negativas obtenidas en las rafidófitas y dinoflagelados una vez superados los 30 segundos de exposición, obedecieron a la disminución en la densidad celular, la cual se asocia con pendientes negativas en las gráficas de desempeño para cada tratamiento (curvas de mortalidad).

6.2.3- Relación tiempo de exposición a ultrasonido v/s porcentaje de viabilidad

La Tabla 13 muestra los coeficientes de determinación (r^2), pendientes (b) y coeficientes de posición (a) específicos para cada cepa obtenidos post aplicación de las regresiones lineales (ec.12). Se observó un alto grado de asociación negativa (promedio $r^2 > 0,9$) entre el tiempo de exposición a ultrasonido y la viabilidad celular dado que un incremento en la primera variable, generó como consecuencia una disminución en la segunda (Fig. 36).

De esta forma, más de cuatro quintiles de los datos experimentales fueron representados por las curvas regresión lineal, consolidando a la ecuación de Sokal y Rohlf como un buen predictor de la relación existente entre las variables y parámetros analizados.

Resulta importante destacar que para lograr idénticos niveles de viabilidad celular en las distintas cepas, fue necesario incrementar el tiempo de exposición a ultrasonido a medida que se migra desde las especies sin frústulo (dinoflagelados y rafidófitas) a las que presentan valvas (diatomeas), encontrando extremos opuestos en *Alexandrium sp* y *Nitzschia sp*. (Fig. 36).

6.2.3.1- Test de validación estadística para pendientes

La Tabla 14 muestra los valores calculados (t_c) y tabulados (t_t) correspondientes a la distribución “t” de Student para ensayos de validación estadística de pendientes (b) obtenidas por medio de regresiones lineales. Todas las pendientes calculadas mostraron validez estadística significativa superando en a lo menos 80% sus valores críticos de aceptación. Las cifras correspondientes a las cepas *Alexandrium sp* y *Nitzschia sp*. destacaron al mostrar un sólido peso estadístico respaldadas por magnitudes de “ t_c ” superior en cinco veces a sus respectivos valores críticos de aceptación.

6.2.3.2- Límites de confianza para los porcentajes de viabilidad

La ecuación 15 describe la forma general para los límites de confianza de los porcentajes de viabilidad asociados a un tiempo de exposición a ultrasonido, mientras que la Tabla 15 muestra los valores específicos correspondientes al error estándar de los coeficientes de regresión lineal (S_b) para cada cepa en estudio. Adicionalmente en la Tabla 16 se presentan en valor absoluto, los límites de confianza para cada cepa y tiempo de exposición a ultrasonido utilizado en el diseño experimental. Como norma general, los valores mínimos (± 14) y máximos (± 67) para los límites de confianza de las viabilidades celulares, presentaron holgadas amplitudes de rango que en la totalidad de los casos superan la décima parte de su valor medio calculado mediante análisis de regresión.

$$Pv (\%) \pm Sb \sqrt{\frac{7}{6} + \frac{(T-25)^2}{1.750}} \quad \text{ec.15}$$

Donde:

Pv = Porcentaje de viabilidad (%)

T = Tiempo de exposición a ultrasonido (s) usado para obtener Pv .

Sb = Error estándar del coeficiente de regresión.

6.2.3.3- Análisis de covarianza (ANCOVA) para pendientes de regresión lineal

La Tabla 17 muestra los valores obtenidos para el análisis de covarianza. Se detectaron diferencias significativas entre los valores de las pendientes (b) asociadas a las regresiones lineales calculadas para cada cepa en estudio.

6.2.3.4- Test de Tukey para grupos homogéneos

La Tabla 18 muestra los resultados obtenidos para la conformación de grupos homogéneos. Se observó la presencia de cuatro grupos asociados a su caracterización taxonómica. La clasificación “1” y “4” reunió a las diatomeas mientras que la agrupación “2” y “3” correspondió a dinoflagelados y rafdófitas respectivamente.

7. – DISCUSIÓN

Durante la última década la ultrasónica ha diversificado su campo de aplicación a temas relacionados con calidad de aguas específicamente en el rubro de las sanitarias, debido a que se ha demostrado su favorable efecto sobre la contaminación de tipo bacteriana, química (toxinas) y biológica (microalgas) presente en fuentes de agua para uso potable y su acción catalizadora en la digestión anaeróbica de lodos y aguas residuales (Mason y Lorimer, 2002). Recientemente un grupo de investigadores de la Universidad de Coventry en el Reino Unido, publicaron un trabajo donde hacen referencia a la intensidad acústica, el tiempo de exposición y la frecuencia como los tres aspectos de mayor relevancia en el manejo del ultrasonido (Wu , *et al.*, 2011). En este sentido, los resultados obtenidos en el primer ensayo, mostraron una clara relación inversa entre el aumento de la intensidad acústica y la viabilidad celular para las cinco cepas analizadas (Fig. 30). Tendencias similares fueron informadas para algas verde azules por Hao y colaboradores en el año 2004, donde demostraron que al incrementar la potencia del sonido en el esquema de 20W,40W , 60W y 80 W se redujo la densidad de *Spirulina platensis* en 26%,40%,42% y 44% respectivamente a una frecuencia de 20kHz durante 5 minutos de exposición. Posteriormente Zhang y colaboradores (2006) ratificaron estos hallazgos, al reportar que incrementado la potencia sónica en la secuencia de 32W, 48W ,64W, 72W y 80 W, era posible aumentar la proporción de extracción para la misma cepa de 83 % a 91 % y 92% disminuyendo a 91% y 87 % respectivamente bajo un tratamiento de 80 kHz, 5 segundos de exposición y 0,4 mg/L de coagulante. Resulta importante señalar que ambos autores mencionaron que si bien un incremento en la potencia del sonido tiene asociado un aumento en el daño celular, este efecto tiene el carácter de asintótico ya que tiende a estabilizarse y no aumentar a partir de cierto valor. Esta afirmación queda avalada por las ecuaciones mostradas en la Tabla 5, de las cuales es posible obtener mediante un simple despeje algebraico, las mínimas intensidades del sonido relacionadas con la detención de la división celular, al igualar a cero los valores de los porcentajes de viabilidad para cada especie en estudio (Tabla 19).

Lee y colaboradores (2001), capturaron mediante microscopía de transmisión electrónica una fotografía donde se evidenciaban las lesiones causadas en las vacuolas de gas de la cianobacteria *Microcystis aeruginosa*, luego de ser sometida a tratamientos ultrasónicos. Posteriormente Hao y colaboradores (2004), lograron imágenes de mejor resolución que evidenciaron el grado de destrucción estructural provocado en *Spirulina plantensis* al ser irradiada con una potencia de 40 W durante 5 minutos a una frecuencia de 1,7 MHz (Fig. 37). Más tarde Zang (c) y colaboradores (2006) reportaron daños en las estructuras celulares ligadas a la actividad fotosintética (cloroplastos) al analizar los efectos del ultrasonido sobre *Microcystis aeruginosa*. Todas estas afirmaciones son concordantes con el tipo de daño estructural evidenciado en las diatomeas *Nitzschia* sp. y *Skeletonema costatum* en el presente trabajo (Fig.38 y Fig.39).

Una vez demostrado que el ultrasonido provocaba daño estructural al fitoplancton, Dehghant y Changai (2006) postularon en sus estudios sobre técnicas de control para clorofíceas provenientes de efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, que dicho efecto era causado por un fenómeno denominado cavitación acústica. El ultrasonido en un medio no elástico como el agua, produce microburbujas que nacen en zonas de baja presión de la onda sonora (valle) donde se alcanza la presión de vapor del líquido circundante, para luego colapsar en regiones de mayor presión (crestas) produciéndose daño celular (Fig.40). La existencia de estas pequeñas burbujas había sido demostrada mediante fotografía electrónica de barrido por Phillips y colaboradores (1998), en sus estudios orientados a mejorar la resolución de las ecografías como método de diagnóstico en humanos (Fig.41). Una década más tarde González-García y colaboradores (2010) en su revisión para tratamientos sonoquímicos destinados a purificar fuentes de agua contaminadas con cloro, presentaron modelos matemáticos que explicaban este fenómeno, argumentando que el daño celular provocado a las células por las burbujas de cavitación era producto de las altas presiones y temperaturas que se registraban en el momento de su colapso. (ec. 16, 17,18 y19).

$$P_{max} = P_o \left[\frac{(P_a + P_h)(\gamma - 1)}{P_o} \right]^{\frac{\gamma}{\gamma - 1}} \quad \text{ec. 16}$$

$$T_{max} = \frac{T_o(P_a + P_h)(\gamma - 1)}{P_o} \quad \text{ec.17}$$

$$P_a = \sqrt{2Ic\rho} \quad \text{ec.18}$$

$$P_h = P_{atm} + \rho gh \quad \text{ec.19}$$

Donde:

P_{max} : máxima presión en colapso de burbuja (Pa).

T_{max} : máxima temperatura en colapso de burbuja (°C).

P_o : presión de vapor del fluido circundante a la burbuja (Pa).

P_a : amplitud de presión acústica (Pa).

P_h : presión hidrostática (Pa).

γ : índice politrópico del gas que conforma la burbuja (adimensional).

T_o : temperatura ambiente del fluido circundante a la burbuja (°C).

I : intensidad acústica (W/m^2).

c : velocidad de sonido en el fluido circúndate a la burbuja (m/s).

ρ : densidad del fluido circundante a la burbuja (K/m^3).

P_{atm} : presión atmosférica (Pa).

g : aceleración de gravedad (m/s^2).

h : profundidad a la que se encuentra sumergida la burbuja (m).

De dichas ecuaciones es posible deducir que al aumentar la intensidad acústica, se incrementan los niveles de presión sonora y temperatura en el interior de las microburbujas, produciendo por ende un mayor daño estructural en las células al momento de su colapso. Dicha relación concuerda plenamente con las curvas de regresión lineal calculadas para cada una de las cinco cepas analizadas en el presente trabajo ya que al incrementar los valores de la intensidad del sonido disminuye la viabilidad celular que es un indicador indirecto del daño causado a las células fitoplanctónicas. (Tabla 5 y Fig. 30)

El carácter asintótico del proceso descrito por Hao y colaboradores (2004) y Zhang y colaboradores (2006) fue explicado por González-García y colaboradores (2010), postulando que cierto nivel de intensidad acústica produce una determinada presión y temperatura de cavitación incompatibles con la capacidad de reparación y división celular de tal forma que no es posible causar mayor daño al fitoplancton al incrementar la intensidad del sonido sobre este valor crítico.

Considerando que $P_0=2.300$ Pa para agua de mar a 20°C (T_0), se desprecia la profundidad del proceso $P_h = P_{\text{atm}} = 101.325$ Pa, $\gamma= 1,2$ para aire húmedo, $c = 1.500$ m/s y $\rho= 1.030$ K/m³ se pueden referenciar los valores de presión y temperatura críticos para cada cepa analizada y aquellos asociados a las intensidades del sonido utilizadas en el diseño experimental (Tabla 19 y 20). Como se puede apreciar, las magnitudes involucradas son elevadas y características para cada cepa. Esta singularidad de los tratamientos ultrasónicos fue descrita por Ahn y colaboradores (2003), al detectar que las células de *Microcystis aeruginosa* respondían selectivamente a las dosis ultrasónicas en relación a las restantes especies componentes del fitoplancton. Krivograd y Griessler-Bule (2010) en sus estudios orientados a encontrar un método eficiente para tratar aguas provenientes de centros de cultivo de carpas, validaron este postulado al encontrar cambios significativos en la abundancia del fitoplancton al ser irradiado con ultrasonido en sistemas de cultivo cerrados.

Junto con la disminución significativa de todas las especies cuantificadas, Krivograd y Griessler- Bule (2010) encontraron una mayor resistencia de las diatomeas sobre todo las de origen bentónico a la dosis ultrasónica empleada. Las diferencias significativas arrojadas por el test de ANCOVA (Tabla 9) para las curvas de regresión entre cepas y la existencia de tres grupos homogéneos evidenciados en el test de Tukey (Tabla 10), concuerdan plenamente con los informes de Krivograd y Griessler - Bule (2010). La mayor resistencia de las diatomeas se ve reflejada en las pendientes más suaves de sus curvas de regresión y sus mayores valores de Pmax y T° max (Fig. 30 y Tabla 19). Otro punto concordante es la mayor resistencia de la especie *Nitzschia* sp. que corresponde a una diatomea bentónica (Tabla 19).

La singularidad de la dosis ultrasónica para cada cepa obedece un fenómeno acústico denominado resonancia, el cual se asocia a la estructura y forma de los cuerpos (Kozuka *et al.*, 2011). En términos simples cada organismo posee la capacidad de absorber mayor cantidad de energía bajo una dosis sónica específica. Zhang y colaboradores (2009) aplicaron con éxito este concepto en microalgas como una herramienta para eliminar eficientemente desde el punto de vista económico, las cianobacterias que contaminaban fuentes de agua potable.

Previo al trabajo de Koda y colaboradores (2003) , un común denominador de las publicaciones relacionadas con el uso del ultrasonido era la nula posibilidad de comparación de resultados debido a los distintos diseños experimentales e innumerables combinaciones de potencia, tiempos de exposición y frecuencias utilizados por los investigadores, condición que desde entonces se denomina dosis sónica. Posteriormente Joyce y colaboradores (2010) propusieron una herramienta matemática para comparar resultados a través del indicador denominado densidad sónica, definido como el cociente entre la potencia utilizada en la experiencia y el volumen del reactor de prueba (W/cm^3).

Usando como base las regresiones lineales de la Tabla 5, conociendo el área (4,34 cm²) y el volumen (35 cm³) del reactor fue posible obtener una relación para obtener la densidad ultrasónica en función de la viabilidad celular (ec. 16).

$$\partial us = \frac{1,2343}{10^5} \left(\frac{Pv - a}{b} \right) \quad \text{ec. 16}$$

Donde:

∂us : densidad ultrasónica (W/cm³).

a : coeficiente de posición corregido ($a = 100$).

b : pendiente de regresión lineal según cepa (consultar Tabla 2).

Pv : viabilidad celular (%) obtenida en diseño experimental.

Utilizando la ecuación 16 y definiendo los valores de viabilidad presentados en Wu y colaboradores (2011) para *Spirulina plantensis* y *Microcystis aeruginosa* sonificadas a 20 KHz, se aprecia que las densidades ultrasónicas necesarias para obtener los mismos resultados en *Alexandrium sp*, *Chaetoceros muellerii*, *Heterosigma akashiwo*, *Nitzschia sp.* y *Skeletonema costatum* superan ampliamente a las cifras reportadas para *Spirulina plantensis* sin embargo se encuentran relativamente cerca de los valores manejados en la segunda cepa de cianobacterias (Tabla 21 y 22). Esta herramienta permitirá establecer un ranking de resistencia al ultrasonido en la medida que se experimente con un mayor número de cepas y definir la potencia de salida de los transductores para volúmenes de cultivo. Se debe considerar que para validar la comparación de resultados es necesario utilizar frecuencias de magnitudes similares.

La mayor resistencia de las diatomeas a las fuentes de ultrasonido fue explicada por Krivograd y Griessler- Bule (2010) argumentando que la cubierta de silicato característica de este tipo de algas actúa como coraza protectora de las partes blandas reflejando y refractando cierta proporción de la energía de una onda acústica.

Conocido el efecto de la intensidad del sonido en la viabilidad de las cepas del presente estudio, resulta lógico pensar que se deben utilizar las intensidades acústicas críticas como método de control inmediato para los bloom de algas nocivas, sin embargo se deben considerar algunos aspectos importantes como la cantidad de energía asociada al proceso y la liberación de ictiotoxinas al medio una vez dañada o destruida la célula fitoplanctónica.

El uso de altas intensidades sonoras tiene directa relación con elevadas potencias acústicas y por ende mayores gastos de energía (Zhang (b) *et al.*, 2006). Si bien la aplicación de bajas intensidades no detiene el crecimiento celular, genera una condición de estrés en las microalgas, situación que disminuye su tasa de replicación y en algunas diatomeas como *Skeletomema costatum*, gatilla la liberación al medio ambiente de metabolitos biológicamente activos denominados aldehídos poli insaturados (API) (Wichard *et al.*, 2005). Los API tienen la particularidad de retardar el crecimiento de otras microalgas y actuar como señal de detención específica para un bloom (Ribalet *et al.*, 2007). La combinación de bajas potencias sumado al efecto de los API podría mejorar la eficiencia del ultrasonido sobre las diatomeas a costos interesantes desde el punto de vista económico.

La aplicación de elevadas potencias acústicas en dinoflagelados y rafidófitas podría provocar la liberación de sus ictiotoxinas al medio ambiente al colapsar las membranas celulares poniendo en riesgo a los planteles de cultivo. Algunos autores han señalado que el uso de dosis ultrasónicas con frecuencias superiores a los 200 Khz podrían inactivar biológicamente estas sustancias (Song *et al.*, 2005) (Pawalee *et al.*, 2011). En tal caso, la configuración de ondas mixtas, una destinada a controlar la proliferación celular y otra a neutralizar la toxina, permitirían superar esta problemática.

En la segunda experiencia, también se observa una relación inversa entre el tiempo de exposición a ondas ultrasónicas y la viabilidad celular (Fig. 36), ratificando los postulados de Joyce y colaboradores (2010) y Wu y colaboradores (2011) quienes manifestaron la relevancia de esta variable como una herramienta válida para el control del fitoplancton mediante ultrasonido. Lee y colaboradores (2001), en sus ensayos de irradiación sónica en cianobacterias, habían reportado una disminución en la actividad fotosintética para *Microcystis viridis* y *Microcystis aeruginosa*, al incrementar el tiempo de exposición en una secuencia de 30,60,90,120 y 150 segundos para potencias de 40W, 120 W y 1.200 W a una frecuencia de 28 Khz. Posteriormente Hao (b) y colaboradores (2004), avalaron estas observaciones al detectar una disminución en la densidad celular de *Spirulina plantensis* en cultivos tratados bajo un régimen de 0,1,3,5,7 y 9 minutos de exposición ultrasónica. Las tendencias publicadas por estos investigadores son plenamente concordantes con las curvas de regresión calculadas para las cinco cepas analizadas en el presente trabajo (Tabla 13).

Los fundamentos teóricos que explican la relación inversa entre la viabilidad celular y el tiempo de exposición a ultrasonido fueron cimentados por Koda y colaboradores (2003) al atribuir a las ondas sonoras propiedades químicas. Su principio se basaba en la síntesis de radicales libres y peróxido de hidrógeno como consecuencia de la formación de burbujas de cavitación, con la consiguiente oxidación de las membranas plasmáticas constituyentes del tejido celular. La tesis fue validada por Ahn y colaboradores (2003) al cuantificar mediante espectrofotometría el incremento en la concentración de OH^\cdot y H_2O_2 conjuntamente con el aumento del tiempo de exposición a ultrasonido. Cortés-Rojo y colaboradores (2009), describieron en detalle los efectos negativos de la oxidación lipídica sobre la integridad estructural de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Finalmente González-García y colaboradores (2010) profundizaron y esquematizaron este principio (Fig. 42).

La reciente publicación de Mason y colaboradores (2011), abre un interesante debate y siembra un manto de duda sobre la teoría de la peroxidación como la posible causa de la relación inversa entre tiempo de exposición y viabilidad celular, tras reportar que los efectos químicos de la cavitación serían relevantes únicamente en frecuencias superiores a los 500 KHz , siendo los efectos físicos de la cavitación los predominantes en frecuencias inferiores a los 35 KHz como la usada en el diseño experimental (23 KHz).

Dehghani y Changani (2006), postularon que formada la burbuja de cavitación, comienza una fase de oscilación, donde se producen fenómenos de dilatación y compresión de la misma, hasta su colapso. Zhang y colaboradores (2009), presentaron una relación matemática para cuantificar el tiempo que transcurre desde la formación hasta el colapso de una burbuja (ec. 17 y18).

$$t = 0,915 Rmax \sqrt{\frac{\rho}{Ph}} \quad \text{ec. 17}$$

$$Rmax = \frac{3,28}{f} \quad \text{ec. 18}$$

Donde:

t = tiempo de existencia de la burbuja (s).

Rmax: radio máximo alcanzado por la burbuja (m).

ρ : densidad del fluido circundante a la burbuja (K/m³).

Ph: presión hidrostática (Pa).

f: frecuencia de la onda ultrasónica (Hz).

Analizando la ec. 17, es posible explicar la disminución de la viabilidad celular al incrementar la exposición acústica, basándose en la premisa que un aumento en el tiempo del tratamiento sónico a una frecuencia fija, genera un mayor número de ciclos de cavitación y por ende unidades de presión acumuladas (UPA) y unidades térmicas acumuladas (UTA) superiores, condiciones que se traducirían en un mayor daño celular.

Despreciando la profundidad del proceso $P_h = P_{atm} = 101.325 \text{ Pa}$ y $\rho = 1.030 \text{ K/m}^3$, se pueden referenciar los valores de los ciclos de cavitación, UPA y UTA asociados a los tiempos de tratamiento usados en el diseño experimental (Tabla 23).

De igual forma que en la intensidad acústica, la pérdida de viabilidad celular presenta una característica asintótica en función del tiempo de exposición. Lee y colaboradores (2001), informaron que una vez superados los 30 segundos de tratamiento sónico en cianobacterias, no se registraron disminuciones en los niveles de clorofila presentes en el medio de cultivo. Ahn y colaboradores (2003), reportaron la misma tendencia, esta vez, en la concentración de radicales libres, transcurridos 3 minutos de tratamiento en *Microcystis aeruginosa*. Finalmente Zhang y colaboradores (2009), encontraron resultados similares al cuantificar los niveles de clorofila transcurridos 10 segundos de exposición a ondas ultrasónicas sobre la misma cepa. Los informes de estos investigados concuerdan plenamente con las ecuaciones mostradas en la Tabla 13, de donde es posible inferir los mínimos intervalos de tiempo relacionados con la detención de la división celular, al igualar a cero los valores de los porcentajes de viabilidad para cada especie en estudio (Tabla 24). Como se puede apreciar, las magnitudes involucradas no superan el orden del minuto y son características para cada cepa, permitiendo elaborar un ranking de resistencia en función de esta variable (Tabla 25). El orden jerárquico es concordante con la tabla elaborada para la intensidad del sonido (Tabla 22), confirmándose la mayor resistencia de las diatomeas a esta técnica.

La singularidad en los tiempos de exposición para tratamientos ultrasónicos asociados a cepas de fitoplancton, fue descrita en los ensayos de Lee y colaboradores (2001), al requerir 10 segundos adicionales en las pruebas sobre *Microcystis viridis* para igualar el nivel de daño celular encontrado en *Microcystis aeruginosa* al tratar ambas especies con idénticas intensidades y frecuencias acústicas. Las diferencias significativas arrojadas por el test de ANCOVA (Tabla 17) para las curvas de regresión entre cepas y la existencia de grupos homogéneos evidenciados en el test de Tukey (Tabla 18), concuerdan plenamente con los resultados del mencionado estudio.

La mayor resistencia de las diatomeas al ultrasonido se ve reflejada en las pendientes más suaves de sus curvas de regresión y sus mayores valores de tiempos límites (Fig. 36 y Tabla 24). Otro punto concordante con la primera experiencia es la mayor resistencia de la especie *Nitzschia* sp., evidenciada por la conformación de un cuarto grupo homogéneo diferenciado del resto de las diatomeas (Tabla 18).

Al ser la cavitación acústica preponderante por sobre la oxidación lipídica en los niveles de frecuencia del diseño experimental, las causas y argumentación para la relación inversa entre el porcentaje de viabilidad y el tiempo de tratamiento ultrasónico así como la mayor resistencia de las diatomeas, obedecen a los mismos principios discutidos en la primera parte de este capítulo (presión, temperatura y cubierta de silicato).

Resulta importante señalar que si bien el efecto de la frecuencia ultrasónica no fue tratado en este estudio debido a la condición monofrecuencial del equipo usado, la selección de la fuente de poder y transductor sónico, se realizó en función de la recomendaciones de Hao y colaboradores (2004), quienes propusieron el uso de frecuencias cercanas a los 20Khz como una herramienta válida para lograr la mayor eficiencia en los procesos de cavitación acústica. La argumentación se basaba en el importante diferencial de presión registrado en la mencionada frecuencia, hecho que se traduce en presiones y temperaturas de colapso de mayor orden (Fig. 43).

El uso de la ultrasónica en acuicultura es de reciente data. Doosti y colaboradores (2012) han reportado que conjuntamente a sus efectos positivos en el control de la proliferación de algas, existen antecedentes que avalan altos desempeños en la reducción de sólidos suspendidos, desinfección, ablandamiento de aguas y eliminación de contaminantes como el D.D.T. [1,1,1-tricloro-2,2-bis (p-clorofenil) etano] y halometanos. Purcell y colaboradores (2009) recomiendan su aplicación como estrategia de manejo para blooms de algas verdes, cianobacterias y diatomeas a nivel industrial, sin embargo, mencionan como una limitante para su uso masivo los costos asociados a la energía requerida (1 KWhm³ = 7 peniques en Reino Unido) para generar las dosis sónicas necesarias para el control de las FAN (> 19 KWhm³ a 20 KHz). Como punto favorable se debe mencionar que el uso de cepas de laboratorio en la determinación de parámetros de diseño para sondas ultrasónicas proporciona un factor de seguridad importante, al encontrarse las microalgas en el mejor escenario desde el punto de vista anatómico y fisiológico. De este hecho, se desprende que el fitoplancton existente en medio natural, presenta una mayor susceptibilidad al ultrasonido, situación a considerar en políticas orientadas a la disminución de los costos operacionales.

8. – CONCLUSIONES

El ultrasonido es un método eficaz para disminuir la proliferación de fitoplancton en condiciones de laboratorio.

La intensidad del sonido, el tiempo de exposición y la frecuencia de onda son determinantes al plantear una estrategia de control para floraciones algales nocivas.

Existe una relación inversa entre la intensidad acústica y la viabilidad celular la cual es característica para las cepas de *Alexandrium sp*, *Chaetoceros muellerii*, *Heterosigma akashiwo*, *Nitzschia sp.* y *Skeletonema costatum*.

Existe una relación inversa entre el tiempo de exposición a ultrasonido y la viabilidad celular la cual es característica para las cepas de *Alexandrium sp*, *Chaetoceros muellerii*, *Heterosigma akashiwo*, *Nitzschia sp.* y *Skeletonema costatum*.

El uso de bajas intensidades ($< 10 \text{ KW/m}^2$) combinadas con tiempos de exposición prolongados (> 1 minuto) se vislumbra como una estrategia eficiente para el control de FAN a escala comercial.

9. – REFERENCIAS

Ahn,C., M.Park, S.Joung, H.Kim, K. Jang y H, Ho. 2003.Growth inhibition of cyanobacteria by ultrasonic radiation: laboratory and enclosure studies. *Environmental Science and Technology*, 37:3031-3037.

Anderson, D., P. Hoagland, Y. Kaoru y A. White. 2000. Estimated Annual Economic Impacts from Harmful Algal Bloom (HABs) in the United States, Technical Report WHOI-2000-11 Woods Hole Oceanographic Institute, Woods Hole, Mass : 1-8 pp.

Anderson, D., P. Andersen, V. Bricelj, J. Cullen y J. Rensel. 2001. Monitoring and management strategies for harmful algal blooms in coastal waters. Apec N°201-MR-01.1, Asia Pacific Economic Program, Singapore and Intergovernmental Oceanographic Comission Technical Series N°59, Paris. 268 pp.

Anderson, D.2009. Approaches to monitoring, control and management of harmful algal blooms (HABs), *Ocean & Coastal Management*, 52:342-347.

Alonso, M. y E. Finn.1987. Física volumen II: Campos y Ondas. Addison-Wesley Iberoamericana S.A., U.S.A., 1032 pp.

Assadi, C., V. Tasso y M. García. 2007. Una revisión del impacto económico de las proliferaciones algales nocivas (PANs) sobre cultivos marinos y estrategias de mitigación. XI congreso Nacional de Acuicultura, Vigo, España: 1-4.

Avaria, S., M. Cáceres,P. Muñoz,S.Palma y P. Vera. 1999. Plan nacional sobre floraciones de algas nocivas en Chile, Comité oceanográfico nacional de Chile, 39 pp. [Enlínea] <http://www.cona.cl/descargas/planfan.pdf> [consulta: 20 de Mayo 2010].

Bruslé, J. 1995. The impact of harmful algal blooms on finfish mortality, pathology and toxicology. *Reperes Ocean* N°10. Ifremer. Francia.

Cañavate, J. y L. Lubinn. 1995. Some aspects on the cryopreservation of microalgae used as food for marine species. *Aquaculture*, 136:277-290.

Cerda, F. 1997. Concentración y preservación de *Isochrysis galbana* (variedad Tahiti) como reserva alimenticia para recursos acuícolas cultivables. Memoria para optar al título de Ingeniero en Acuicultura. Universidad Católica del Norte, facultad de ciencias del mar, departamento de acuicultura, sede Coquimbo, Chile.

Clement, A. 2003. Las mareas rojas y la salmonicultura. En : Salmonicultura en el sur de Chile, Compendio 2003, Soc. Periodística Araucanía S.A. (Ed), Diario el Llanquihue, Chile. Pp. 1-5.

Cortés-Rojo, Ch., M. Estrada, S. Manzo y A. Saavedra. 2009. Influencia de la peroxidación de lípidos sobre el daño oxidativo mitocondrial y la integridad de *Saccharomyces cerevisiae*. Información Tecnológica, 20 (2): 71-81.

Cupp, E. 1943. Marine plankton diatoms of the west coast of north America. University of California Press, USA, 235 pp.

Dehghani, M y F. Changani .2006. The effect of acoustic cavitation on Chlorophyceae from effluent of wastewater treatment plant. Environmental Technology, 27: 963-968.

Doosti, M.,R. Kargar y M. Sayadi. 2012. Water treatment using ultrasonic assistance: A review. Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences, 2012, 2 (2): 96-110.

Folke, C., N. Kautsky y M. Troell. 1994. The costs eutrophication from salmon farming: Implications for policy. Journal of environmental management, 40: 173-182.

Fuica, N., X. Rojas, A. Clément, V. Bittner, M. Silva y C. Uribe. 2007. Ocurrencia e impacto de las FANs en la salmonicultura en el sur de Chile: Análisis de programa de monitoreo de Intesal de Salmon Chile. [En línea] Revista Salmo Ciencia, Puerto Montt, Chile <<http://www.salmonchile.cl/salmociencia/002/>> [consulta: 18 de Mayo 2010].

Godínez, D., A. Hernández, J. Orozco y S. Godínez .2003. Valoración entre la tasa de ingestión y la supervivencia de larvas camarónzul *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson,

1871) nutridas con diferentes concentraciones de *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen). *Zootecnia Trop.*, 21(2):133-147.

González-García, J., V. Sáez, I. Tudela, M. Díez- García, M. Esclapez y O. Louisnard. 2010. Sonochemical treatment of water polluted by chlorinated organocompounds. *Water*, 2: 28-74.

Hallegraeff, G.1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32:79-99.

Hao, H., M. Wu, Y. Chen, J. Tang y Q. Wu. 2004. Cavitation mechanism in cyanobacterial growth inhibition by ultrasonic irradiation. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 33: 151-156.

Hao (b), H., M. Wu, Y. Chen, J. Tang y Q. Wu. 2004. Cyanobacterial Bloom control by ultrasonic irradiation at 20KHz and 1,7 MHz. *Journal of environmental science and health part A. Toxic / Hazardous substances and environmental engineering*, 39(6): 1.435- 1.446.

Hawkins, A. y A. Johnstone .1978. Hearing of the atlantic salmon, *Salmo salar*. *J. Fish Biol.* 13: 655-670.

Joyce, M., X. Wu y T. Mason. 2010. Effect of ultrasonic frequency and power on algae suspensions. *Journal of Environmental Science and Health part A*, 45:893-866.

Koda,S., T. Kimura, T. Kondo y H. Mitome.2003. A standard method to calibrate sonochemical efficiency of an individual reaction system. *Ultrasonic Sonochemistry*, 10:149-156.

Kozuka, T., K. Yasui, S. Hatanaka, T. Tuziuti, K. Suzuki y A. Towata. 2011. Manipulation of particles in a microchannel with various geometric spaces using ultrasound. *Japanese Journal of Applied Physics*, 50: 07HE27.

Krivograd, A y T. Griessler-Bule. 2010. The efficiency of ultrasound on algal control in a closed loop water treatment system for cyprinid fish farms. *Fresenius Environmental Bulletin*, 19: 919-931.

Larson, M. y B. Mariñas. 2003. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores with ozone and monochloramine. *Water Research*, 37: 833-844.

Lee, T., K. Nakano and M. Matsumara. 2001. Ultrasonic irradiation for blue-green algae bloom control. *Environmental Technology*, 22: 383-390.

Lieschke, G. y P. Currie. 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics*, 8: 353-367.

Mackenzie, K. 1981. Nine-term equation for sound speed in the oceans. *Acoustical Society of America*, 70 (3):807-812.

Marín, L. 2009. Análisis de la ley de cuadrado inverso para medición práctica de iluminancia. *Ingeniería* 19 (1): 87-96.

Mason, T. y J. Lorimer. 2002. *Applied Sonochemistry*. Wiley – VCH, Germany, 303pp.

Mason, T., A. Cobley, J. Graves y D. Morgan. 2011. New evidence for the inverse dependence of mechanical and chemical effects on the frequency of ultrasound. *Ultrasonic Sonochemistry*, 18: 226 - 230.

Moreno, R. 1990. La ecosondación como método de estudio de la dinámica poblacional de peces. *Scientia gerundensis* 16 (1):19-28.

Pawalee, S., N. Whangchai, Y. Yagita, K. Okada, Y. Peerapornpisal y N. Nomura. 2011. Effects of ultrasonic irradiation on degradation of Microcystin in fish ponds. *International Journal of Agriculture and Biology*, 13 (1): 67-70.

Phillips, D., X. Chen, R. Baggs, D. Rubens y M. Violante. 1998. Acoustic backscatter properties of the particle/bubble ultrasound contrast agent. *Ultrasonics*, 36: 883-892.

Popper, A. y D. Ketten. 2008. "Underwater hearing," in *The Senses – A comprehensive reference*, edited by A. I. Bassbaum, A. Kaneko, G. M. Shepherd, and G. Westheimer (Elsevier Press, Oxford), pp. 225-236.

Purcell, D. 2009. Control of Algal Growth in Reservoirs with Ultrasound. PhD Thesis. Cranfield University, UK.

Renaud, S., L. Thinh, y D. Parry. 1999. The gross chemical composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture* 170: 147-159.

Rensel, J. 1995. Management of finfish aquaculture resources. En: *Manual on Harmful Marine Microalgae*. G. Hallegraeff (eds). Unesco. Paris, France. Pp. 463-474.

Rensel, J. y J. Whyte. 2003. Finfish mariculture and harmful algal blooms. En: *Manual on Harmful Marine Microalgae*. G. Hallegraeff (eds). Unesco. Paris, France. Pp. 693-722.

Rensel, J. 2007. Fish kills from the harmful alga *Heterosigma akashiwo* in Puget Sound: Recent blooms and review. Rensel Associates Aquatic Sciences, Arlington, Washington, USA [En línea] <http://www.who.edu/fileserver.do?id=39383&pt=2&p=29109> [consulta: 19 de Mayo 2010].

Ribalet, F., J. Berges, A. Ianora, y R. Casotti. 2007. Growth inhibition of cultured marine phytoplankton by toxic algal- derived polyunsaturated aldehydes. *Aquatic Toxicology*, 85: 219-227.

Sar, E., M. Ferrario y B. Reguera, 2002. Floraciones algales nocivas en el cono sur americano. Instituto español de oceanografía, Madrid, España, 310 pp.

Scheffler, W. 1981. Bioestadística. Fondo educativo interamericano S.A., México, 267 pp.

Servicio Nacional de Pesca. 2012. Informe sanitario de salmonicultura en centros marinos, trimestre Enero - Marzo 2012. Unidad de salud animal, subdirección de acuicultura [En línea] <http://www.sernapesca.cl> [consulta: 21 de Agosto 2012].

Serway, R. 1997. Física. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana, México, 529 pp.

Sokal, R. y F. Rolf. 1984. Introducción a la Bioestadística, Editorial Reverté, Barcelona, España, 362 pp.

Song, W., T. Teshiba, K. Rein y K. O'shea. 2005. Ultrasonically induced degradation and detoxification of Microcystin -LR (cyanobacterial toxin). *Environmental Science and Technology*, 29: 6.300-6.305.

Tomas, C. 1996. Identifying marine diatoms and dinoflagellates. Academic press Inc, San Diego, California, USA, 585 pp.

Vergara, M. 2010. Sistema de ahuyentamiento de lobos marinos, *Incuba* 1 (2):12-13.

Wichard, T., S. Poulet, C. Halsband-Lenk, A. Albana, R. Harris, D. Liu y G. Pohnert. 2005. Survey of the chemical defence potential of diatoms: Screening of fifty one species for α , β , δ - unsaturated aldehydes. *Journal of Chemical Ecology*, 31: 949- 958.

Wu, X., E. Joyce y T. Mason. 2011. The effects of ultrasound on cyanobacteria. *Harmful Algae*, 10: 738-743.

Yan ,H., K. Anraku y R. Babaran. 2010. Hearing in Marine Fish and Its Application in Fisheries. In: Behavior of Marine Fishes: Capture Processes and Conservation Challenges, (Ed) P. He Wiley- Blackwell, Ames, Iowa, pp 45-64.

Zar, J. 1999. Biostatistical Analysis, 4º edición, Editorial Prentice Hall, New Jersey, EEUU, 898 pp.

Zhang, G., B. Wang, P. Zhang, L. Wang y H. Wang. 2006. Removal of algae by sonication – coagulation. Journal of environmental science and health part A, 41:1379 - 1390.

Zhang (b), G., P. Zhang , B. Wang y H.Liu. 2006. Ultrasonic frequency effects the removal of *Microcystis aeruginosa* . Ultrasonics Sonochemistry ,13: 446- 450.

Zhang (c), G., P. Zhang, H. Liu y B. Wang. 2006. Ultrasonic damages on cyanobacterial photosynthesis. Ultrasonics Sonochemistry, 13: 501-505.

Zhang, G., P. Zhang y M. Fan. 2009. Ultrasound – enhanced coagulation for *Microcystis aeruginosa* removal. Ultrasonics Sonochemistry ,16: 334-338.

10. – ANEXOS

Tabla 1. Selección de cepas y sustitutos de pruebas.

Table 1: Selection of test strains and substitutes.

Grupo	Especie	Origen	Clave	Sustituto de pruebas	Origen	Clave	Pérdidas económicas en cultivo de salmónidos
Diatomeas	<i>Chaetoceros convolutus</i>	COPAS	COChc	<i>Chaetoceros muellerii</i>	LPP	LPPCHm	US\$ 17.500.000
Diatomeas	<i>Rhizocolenia setigera</i>	COPAS	CORc	<i>Nitzschia</i> sp.	LPP	LPPNsp	US\$ 17.500.000
Diatomeas	<i>Skeletonema costatum</i>	LPP	LPPSt	NO	N/A	N/A	US\$ 17.500.000
Dinoflagelados	<i>Alexandrium catenella</i>	CERAM	CEAc	<i>Alexandrium</i> sp.	CERAM	CEAt	US\$ 20.000.000
Rafidófitas	<i>Heterosigma akashiwo</i>	LPP	LPPHa	NO	N/A	N/A	US\$ 43.000.000

LPP : Cepario del Laboratorio de Producción Primaria, Universidad Católica del Norte , IV región, Chile.

COPAS : Cepario COPAS Sur Austral de la Universidad de Concepción, VIII región, Chile.

CERAM: Cepario del Centro Regional de Análisis de Recursos y Medio Ambiente de la Universidad Austral de Chile, X región, Chile.

N/A : No aplica.

Tabla 2. Medio de cultivo para fitoplancton f/2 modificado Uribe (1995).

Table 2: Phytoplankton culture medium f / 2 modified Uribe (1995).

Macro nutrientes	Fórmula química	Concentración
Salitre sódico	NaNO ₃	150,00 g/L
Súper fosfato triple	NaH ₂ PO ₄ ×H ₂ O	10,00 g/L
Micronutrientes	Fórmula química	Concentración
Sulfato cúprico	CuSO ₄	1,96 g/L
Sulfato de Zinc	ZnSO ₄ ×7 H ₂ O	4,40 g/L
Cobalto clorado	CoCl ₂ ×6 H ₂ O	2,00 g/L
Manganeso di clorado	MnCl ₂ ×4 H ₂ O	36,00 g/L
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ ×2 H ₂ O	1,26 g/L
Vitaminas		Concentración
B-12 cristalina		1×10 ⁻³ g/L
Tiamina hidrociorada		1×10 ⁻¹ g/L

Tabla 3. Valores de las pendientes (b) para las curvas de crecimiento (intensidad del sonido).

Table 3: Values of the slopes to the growth curves (sound intensity).

Grupo	Cepa	P (W)	I (W/m ²)	<i>b</i> (*) $y = ax^b$		r ²
Diatomeas	LPPCHm	0	0	1,8790	<i>bt</i>	0,98
		5	11.430	1,7109	<i>bc1</i>	0,82
		8	18.288	1,5032	<i>bc2</i>	0,84
		10	22.861	1,0334	<i>bc3</i>	0,86
		13	29.719	0,4811	<i>bc4</i>	0,81
		15	34.291	0,8455	<i>bc5</i>	0,75
	LPPSk	0	0	0,3140	<i>bt</i>	0,90
		5	11.430	0,2706	<i>bc1</i>	0,89
		8	18.288	0,1942	<i>bc2</i>	0,80
		10	22.861	0,1824	<i>bc3</i>	0,92
		13	29.719	0,1352	<i>bc4</i>	0,91
		15	34.291	0,1069	<i>bc5</i>	0,85
	LPPNsp	0	0	0,2227	<i>bt</i>	0,79
		5	11.430	0,1868	<i>bc1</i>	0,74
		8	18.288	0,1524	<i>bc2</i>	0,80
		10	22.861	0,1497	<i>bc3</i>	0,72
		13	29.719	0,1427	<i>bc4</i>	0,87
		15	34.291	0,1311	<i>bc5</i>	0,72
Dinoflagelados	CEAt	0	0	0,3192	<i>bt</i>	0,87
		5	11.430	0,1698	<i>bc1</i>	0,99
		8	18.288	0,0827	<i>bc2</i>	0,81
		10	22.861	0,0170	<i>bc3</i>	0,74
		13	29.719	0,0398	<i>bc4</i>	0,85
		15	34.291	0,0132	<i>bc5</i>	0,92
Rafidófitas	LPPHa	0	0	0,7197	<i>bt</i>	0,78
		5	11.430	0,3807	<i>bc1</i>	0,96
		8	18.288	0,4102	<i>bc2</i>	0,99
		10	22.861	0,2879	<i>bc3</i>	0,95
		13	29.719	0,1367	<i>bc4</i>	0,99
		15	34.291	0,0576	<i>bc5</i>	0,95

P= potencia acústica expresada en watts.

I= intensidad del sonido expresado en W/m².

b (*) = valor de la pendiente correspondiente a regresión geométrica (ec. 10).

r²= coeficiente de determinación para la regresión geométrica (ec. 10).

Tabla 4. Porcentajes de viabilidad correspondientes a cepas e intensidad del sonido.

Table 4: Percentage of viability for strains and intensity of sound.

Grupo	Cepa	P (W)	I (W/m ²)	Pv (%)
Diatomeas	LPPCHm	0	0	100
		5	11.430	91
		8	18.288	80
		10	22.861	55
		13	29.719	26
		15	34.291	45
	LPPSk	0	0	100
		5	11.430	86
		8	18.288	62
		10	22.861	58
		13	29.719	43
		15	34.291	34
	LPPNsp	0	0	100
		5	11.430	84
		8	18.288	68
		10	22.861	67
		13	29.719	64
		15	34.291	59
Dinoflagelados	CEAt	0	0	100
		5	11.430	53
		8	18.288	26
		10	22.861	5
		15	34.291	4
Rafidófitas	LPPHa	0	0	100
		5	11.430	53
		8	18.288	57
		10	22.861	40
		13	29.719	19
		15	34.291	8

P = potencia acústica expresada en watts.

I = intensidad del sonido expresado en W/m².

Pv (%) = porcentaje de viabilidad obtenido a partir de la ecuación 9.

Tabla 5. Coeficientes de regresión y correlación para intensidad del sonido v/s porcentaje de viabilidad.

Table 5. Regression coefficients and correlation to intensity of sound v/s percentage of viability.

Grupo	Cepa	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>r</i> ²
Diatomeas	LPPCHm	-0,0021	106,92	0,86
	LPPSk	-0,0020	102,49	0,97
	LPPNsp	-0,0012	96,83	0,93
Dinoflagelados	CEAt	-0,0028	87,98	0,88
Rafidófitas	LPPHa	-0,0025	95,39	0,95

$$Pv \% = a + b \times I\left(\frac{W}{m^2}\right)$$

Tabla 6. Test para pendiente predictiva vertical "b" (intensidad del sonido v/s porcentaje de viabilidad).

Table 6. Test for predictive vertical slope "b" (sound intensity v / s percentage of viability).

Grupo	Cepa	tc	tt	Regla de decisión	Validez estadística
Diatomeas	LPPCHm	4,375	2,776	Rechaza H ₀	Significativa
	LPPSk	9,863	2,776	Rechaza H ₀	Significativa
	LPPNsp	5,655	2,776	Rechaza H ₀	Significativa
Dinoflagelados	CEAt	5,522	2,776	Rechaza H ₀	Significativa
Rafidófitas	LPPHa	10,949	2,776	Rechaza H ₀	Significativa

H₀: b = 0; H₁: b ≠ 0

Tabla 7. Errores estándar para coeficientes de regresión lineal (intensidad del sonido v/s porcentaje de viabilidad).

Table 7. Standard errors for linear regression coefficients (sound intensity v / s percentage viability).

Grupo	Cepa	Sb
Diatomeas	LPPCHm	37,24
	LPPSk	15,73
	LPPNsp	16,46
Dinoflagelados	CEAt	39,34
Rafidófitas	LPPHa	17,72

Tabla 8. Límites de confianza (LC) para los porcentajes de viabilidad correspondientes a cepas e intensidad del sonido.

Table 8. Confidence limits (CL) for the percentage of viability for strains and intensity of sound.

Grupo	Cepa	P (W)	I (W/m ²)	Pv (%) proyectado	± LC
Diatomeas	LPPCHm	0	0	107	48
		5	11.430	83	42
		8	18.288	69	40
		10	22.861	59	40
		13	29.719	45	42
		15	34.291	35	45
	LPPSk	0	0	102	20
		5	11.430	80	18
		8	18.288	66	17
		10	22.861	57	17
		13	29.719	43	18
		15	34.291	34	19
	LPPNsp	0	0	97	21
		5	11.430	83	18
		8	18.288	75	18
		10	22.861	69	18
		13	29.719	61	19
		15	34.291	56	20
Dinoflagelados	CEAt	0	0	88	51
		5	11.430	56	44
		8	18.288	37	43
		10	22.861	24	43
		13	29.719	5	45
		15	34.291	-8	47
Rafidófitas	LPPHa	0	0	95	23
		5	11.430	67	20
		8	18.288	50	19
		10	22.861	38	19
		13	29.719	21	20
		15	34.291	10	21

P = potencia acústica expresada en watts.

I = intensidad del sonido expresado en W/m².

Pv (%) proyectado = porcentaje de viabilidad proyectado obtenido a partir de la Tabla 5.

± LC = límite de confianza obtenido a partir de ecuación 14 y Tabla 7.

Tabla 9. Análisis de covarianza para intensidad del sonido v/s viabilidad celular.

Table 9. Analysis of covariance for sound intensity v / s cell viability.

Efecto	SC	GL	CM	F	p	Regla de decisión	Dif. estadística
Interceptar	7,836077	1	7,836077	1309,914	0,000000		
Cepas	0,007746	4	0,001936	0,324	0,858733		
Potencias	0,894638	1	0,894638	149,552	0,000000		
Pendientes (b)	0,136493	4	0,034123	5,704	0,003130	Rechaza H0	Significativa
Error	0,119643	20	0,005982				

H0: $b_1=b_2=b_3=b_4=b_5$ $\alpha = 0,05$

H1: $b_1 \neq b_2 \neq b_3 \neq b_4 \neq b_5$

Tabla 10. Test de Tukey para cepas (intensidad del sonido v/s viabilidad celular).

Table 10. Tukey test strains (sound intensity v / s cell viability).

Tukey HSD test; variable % de Viabilidad corregido Homogenous Groups, alpha = 0,05 Error: Between MS = 0,00598, df = 20,					
Cell No.	Microalga	% de Viabilidad corregido Mean	1	2	3
4	Alexandrium sp	0,501322		****	
5	Heterosigma akashiwo	0,639030			****
2	Skeletonema costatum	0,785863	****		
1	Chaetoceros muellerii	0,795118	****		
3	Nitzschia sp	0,854631	****		

Tabla 11. Valores de las pendientes (b) para las curvas de crecimiento (tiempo de exposición).

Table 11. Values of the slopes (b) curves of growth (exposure time).

Grupo	Cepa	T (s)	$b (*) \quad y= ax^b$		r^2
Diatomeas	LPPCHm	0	0,9361	<i>bt</i>	0,99
		10	0,8992	<i>bc1</i>	0,83
		20	0,5048	<i>bc2</i>	0,89
		30	0,2443	<i>bc3</i>	0,94
		40	0,1965	<i>bc4</i>	0,89
		50	0,0936	<i>bc5</i>	0,97
	LPPSk	0	0,8303	<i>bt</i>	0,98
		10	0,6390	<i>bc1</i>	0,82
		20	0,2446	<i>bc2</i>	0,78
		30	0,1917	<i>bc3</i>	0,87
		40	0,0170	<i>bc4</i>	0,60
		50	0,0793	<i>bc5</i>	0,86
	LPPNsp	0	0,5990	<i>bt</i>	0,96
		10	0,5699	<i>bc1</i>	0,86
		20	0,3996	<i>bc2</i>	0,83
		30	0,3235	<i>bc3</i>	0,86
		40	0,2216	<i>bc4</i>	0,77
		50	0,1258	<i>bc5</i>	0,98
Dinoflagelados	CEAt	0	0,2510	<i>bt</i>	0,87
		10	0,1456	<i>bc1</i>	0,91
		20	0,0552	<i>bc2</i>	0,95
		30	-0,0251	<i>bc3</i>	0,92
		40	-0,1104	<i>bc4</i>	0,80
		50	-0,2309	<i>bc5</i>	0,84
Rafidófitas	LPPHa	0	4,7366	<i>bt</i>	0,98
		10	2,0790	<i>bc1</i>	0,84
		20	1,9694	<i>bc2</i>	0,89
		30	-0,4870	<i>bc3</i>	0,90
		40	-0,5830	<i>bc4</i>	0,94
		50	-0,6170	<i>bc5</i>	0,96

T= tiempo de exposición a ultrasonido expresado en segundos.

b (*) = valor de la pendiente correspondiente a regresión geométrica (ec. 10).

r^2 = coeficiente de determinación para la regresión geométrica (ec. 10).

Tabla 12. Porcentajes de viabilidad correspondientes a cepas y tiempo de exposición a ultrasonido.

Table 12. Percentage of viability for strains and time of exposure to ultrasound.

Grupo	Cepa	T (s)	Pv (%)
Diatomeas	LPPCHm	0	100
		10	96
		20	54
		30	26
		40	21
		50	10
	LPPSk	0	100
		10	77
		20	29
		30	23
		40	2
		50	10
	LPPNsp	0	100
		10	95
		20	67
		30	54
		40	37
		50	21
Dinoflagelados	CEAt	0	100
		10	58
		20	22
		30	-10
		40	-44
		50	-92
Rafidófitas	LPPHa	0	100
		10	44
		20	42
		30	-10
		40	-12
		50	-13

T= tiempo de exposición a ultrasonido expresado en segundos.

Pv (%) = porcentaje de viabilidad obtenido a partir de la ecuación 9.

Tabla 13. Coeficientes de regresión y correlación para tiempo de exposición a ultrasonido v/s porcentaje de viabilidad.

Table 13. Regression coefficients and correlation to ultrasound exposure time v / s percentage of viability.

Grupo	Cepa	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>r</i> ²
Diatomeas	LPPCHm	-2,0089	101,39	0,92
	LPPSk	-1,9524	89,00	0,86
	LPPNsp	-1,6644	103,93	0,98
Dinoflagelados	CEAt	-3,7086	98,38	0,99
Rafidófitas	LPPHa	-2,2446	81,09	0,85

$$Pv \% = a + b \times T(s)$$

Tabla 14. Test para pendiente predictiva vertical "b" (tiempo de exposición a ultrasonido v/s porcentaje de viabilidad).

Table 14. Predictive Test for vertical slope "b" (time of exposure to ultrasound v / s percentage of viability).

Grupo	Cepa	tc	tt	Regla de decisión	Validez estadística
Diatomeas	LPPCHm	6,983	2,776	Rechaza H ₀	Significativa
	LPPSk	4,993	2,776	Rechaza H ₀	Significativa
	LPPNsp	14,768	2,776	Rechaza H ₀	Significativa
Dinoflagelados	CEAt	33,354	2,776	Rechaza H ₀	Significativa
Rafidófitas	LPPHa	4,798	2,776	Rechaza H ₀	Significativa

$$H_0: b = 0; H_1: b \neq 0$$

Tabla 15. Errores estándar para coeficientes de regresión lineal (tiempo de exposición a ultrasonido v/s porcentaje de viabilidad).

Table 15. Standard errors for linear regression coefficients (exposure to ultrasound v / s percentage of viability).

Grupo	Cepa	Sb
Diatomeas	LPPCHm	33,41
	LPPSk	45,41
	LPPNsp	13,09
Dinoflagelados	CEAt	12,91
Rafidófitas	LPPHa	54,32

Tabla 16. Límites de confianza (LC) para los porcentajes de viabilidad correspondientes a cepas y tiempo de exposición a ultrasonido.

Table 16. Confidence limits (CL) for the percentage of viability for strains and time of exposure to ultrasound.

Grupo	Cepa	T (s)	P_v (%) proyectado	\pm LC
Diatomeas	LPPCHm	0	101	41
		10	81	38
		20	61	36
		30	41	36
		40	21	38
		50	1	41
	LPPSk	0	89	56
		10	69	52
		20	50	49
		30	30	49
		40	11	52
		50	-9	56
	LPPNsp	0	104	16
		10	87	15
		20	71	14
		30	54	14
		40	37	15
		50	21	16
Dinoflagelados	CEAt	0	98	16
		10	61	15
		20	24	14
		30	-13	14
		40	-50	15
		50	-87	16
Rafidófitas	LPPHa	0	81	67
		10	59	62
		20	36	59
		30	14	59
		40	-9	62
		50	-31	67

T= tiempo de exposición a ultrasonido expresado en segundos.

P_v (%) proyectado = porcentaje de viabilidad proyectado obtenido a partir de la Tabla 13.

\pm LC = límite de confianza obtenido a partir de ecuación 15 y Tabla 15.

Tabla 17. Análisis de covarianza (ANCOVA) para tiempo de exposición a ultrasonido v/s viabilidad celular.

Table 17. Analysis of covariance for ultrasound exposure time v / s cell viability.

Efecto	SC	GL	CM	F	p	Regla de decisión	Dif. estadística
Interceptar	8,215190	1	8,215190	2109,349	0,000000		
Cepas	0,146999	4	0,036750	9,436	0,000271		
Tiempo	5,162474	1	5,162474	1325,527	0,000000		
Pendientes (b)	0,701229	4	0,175307	45,012	0,000000	Rechaza H0	Significativa
Error	0,070104	18	0,003895				

H0: $b_1=b_2=b_3=b_4=b_5$ $\alpha = 0,05$

H1: $b_1 \neq b_2 \neq b_3 \neq b_4 \neq b_5$

Tabla 18. Test de Tukey para cepas (tiempo de exposición a ultrasonido v/s viabilidad celular).

Table 18. Tukey test strains (ultrasound exposure time v / s cell viability).

Tukey HSD test; variable % de Viabilidad corregido Homogenous Groups, alpha = 0,05 Error: Between MS =0,00389, df = 18						
Cell No.	Microalga	% de Viabilidad corregido Mean	1	2	3	4
4	Alexandrium sp	0,097716		****		
5	Heterosigma akashiwo	0,279496			****	
1	Chaetoceros muellerii	0,450644	****			
2	Skeletonema costatum	0,453435	****			
3	Nitzschia sp	0,601461				****

Tabla 19. Valores de presión y temperatura de cavitación asociados a la intensidad del sonido límite.

Table 19. Values pressure and temperature associated with cavitation loudness limit.

Grupo	Cepa	I c (W/m ²)	P max (T Pa)	T°max (°C)
Diatomeas	LPPCHm	50.914	15,161	866
	LPPSk	51.245	15,398	868
	LPPNsp	80.692	46,700	1.045
Dinoflagelados	CEAt	31.421	4,928	718
Rafidófitas	LPPHa	38.156	7,689	773

I c = intensidad del sonido crítica (viabilidad celular = 0).

P max= máxima presión de cavitación (Tera Pascal).

T° max = máxima temperatura de cavitación (° Celcius).

Tabla 20. Valores de presión y temperatura de cavitación alcanzados en el diseño experimental.

Table 20. Data pressure and temperature of cavitation achieved in experimental design.

I exp (W/m ²)	P max (T Pa)	T°max (°C)
11.430	0,582	503
18.288	1,510	590
22.861	2,433	638
29.719	4,346	703
34.291	6,013	742

I exp = intensidad del sonido utilizada en diseño experimental.

P max= máxima presión de cavitación (Tera Pascal).

T° max = máxima temperatura de cavitación (° Celcius).

Tabla 21. Comparación de valores para densidad acústica en función de la viabilidad celular y tipo de cepas.

Table 21. Comparison of acoustic density values depending on the type of cell viability and strains.

Cepa	a (corregido)	b	<i>Spirulina plantensis</i> * (Hao et al., 2004)	<i>Microcystis aeruginosa</i> ** (Zhang (a) et al., 2006)
			Densidad acustica para Pv= 67 % (W/cm3)	Densidad acustica para Pv= 86 % (W/cm3)
<i>Chaetoceros muellerii</i>	100	0,0021	0,1940	0,0823
<i>Skeletonema costatum</i>	100	0,0020	0,2037	0,0864
<i>Nitzschia</i> sp.	100	0,0012	0,3394	0,1440
<i>Alexandrium</i> sp.	100	0,0028	0,1455	0,0617
<i>Heterosigma akashiwo</i>	100	0,0025	0,1629	0,0691

* Densidad acústica informada por el autor para alcanzar 67% de viabilidad en *Spirulina plantensis*: 0,014 W/cm3.

** Densidad acústica informada por el autor para alcanzar 86% de viabilidad en *Microcystis aeruginosa*: 0,080W/cm3.

Tabla 22. Ranking descendente para la resistencia a ultrasonido en función de la densidad acústica.

Table 22. Descending rank resistance to ultrasound acoustic function of the density.

Clasificación taxonómica	Cepa
Diatomea	<i>Nitzschia</i> sp.
Diatomea	<i>Skeletonema costatum</i>
Diatomea	<i>Chaetoceros muellerii</i>
Cianobacterias	<i>Microcystis aeruginosa</i>
Rafidófita	<i>Heterosigma akashiwo</i>
Dinoflagelado	<i>Alexandrium</i> sp.
Cianobacterias	<i>Spirulina plantensis</i>

Tabla 23. Ciclos de cavitación, UPA y UTA asociados a los tiempos de tratamiento ultrasónicos del diseño experimental.

Table 23. Cavitation cycles, UPA and UTA associated ultrasonic treatment times of experimental design.

Tiempo de tratamiento (s)	N° de ciclos de cavitación	UPA (E Pa)	UTA (M°C)
10	760.103	0,4427	382
20	1.520.207	0,8854	764
30	2.280.310	1,3281	1.147
40	3.040.413	1,7708	1.529
50	3.800.516	2,2135	1.911

UPA: unidades de presión acumuladas (Exa Pascal).

UTA: unidades de temperatura acumuladas (Mega Celcius).

Tabla 24. Tiempos críticos en función de la cepa irradiada.

Table 24. Critical times depending on the strain irradiated.

Grupo	Cepa	Tiempo (s)
Diatomeas	LPPCHm	50
	LPPSk	46
	LPPNsp	62
Dinoflagelados	CEAt	27
Rafidófitas	LPPHa	36

$$I = 11.430 \text{ W/m}^2 ; f = 23 \text{ Khz.}$$

Tabla 25. Ranking descendente para la resistencia a ultrasonido en función del tiempo de exposición.

Table 25. Ranking down for resistance to ultrasound as a function of exposure time.

Clasificación	Cepa
Diatomea	<i>Nitzschia sp.</i>
Diatomea	<i>Chaetoceros muellerii</i>
Diatomea	<i>Skeletonema costatum</i>
Rafidófitas	<i>Heterosigma akashiwo</i>
Dinoflagelado	<i>Alexandrium sp.</i>

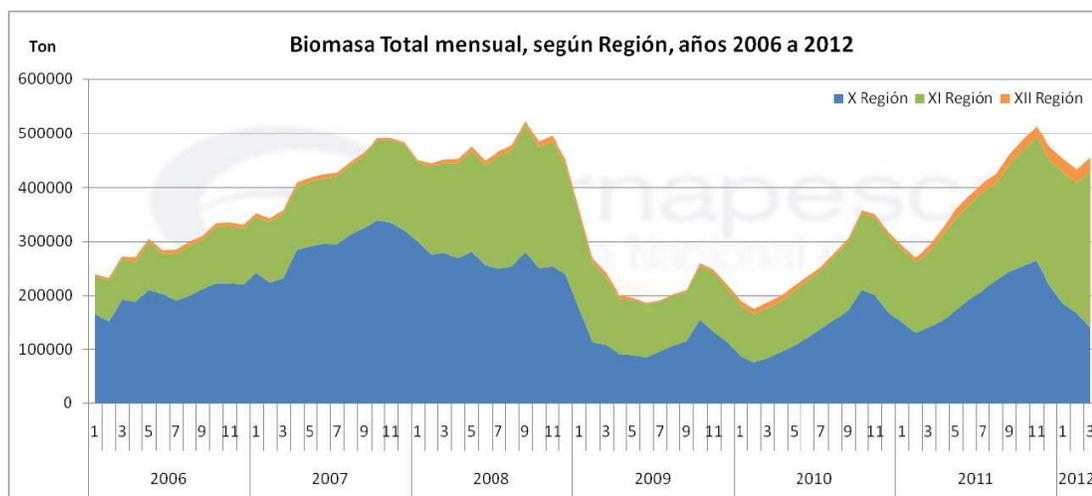


Figura 1. Evolución de la biomasa total de salmónidos cultivados en Chile por región desde el año 2006 al año 2012 (Servicio Nacional de Pesca, 2012).

Figure 1. Evolution of the total biomass of farmed salmonids in Chile by region from 2006 to 2012 (National Marine Fisheries Service, 2012).



Figura 2. Floración algal inocua ocurrida en California causada por la especie *Noctiluca* sp. (Avaria *et al.*, 2009).

Figure 2. Harmless algal bloom occurred in California caused by the species *Noctiluca* sp. (Avaria *et al.*, 2009).



Figura 3. Mortalidad de *Salmo salar* provocada por la floración de *Chaetoceros convolutus* en el mar interior de la XI región de Chile en el año 2008 (archivo personal).

Figure 3. Mass mortality of *Salmo salar* caused by the bloom of *Chaetoceros convolutus* inland sea in the XI region of Chile in 2008 (personal archive).

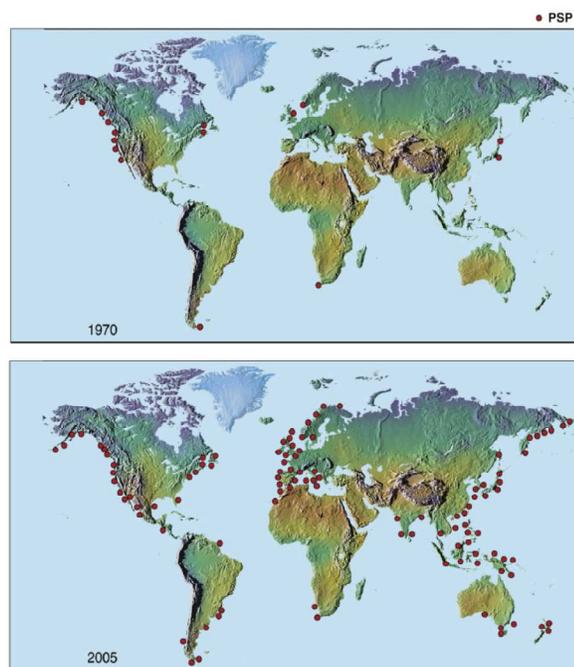


Figura 4. Evolución mundial de las floraciones algales nocivas de dinoflagelados productores de veneno paralizante del marisco (VPM) entre el año 1970 y 2005 (Anderson, 2009).

Figure 4. Global trends of harmful algal blooms of dinoflagellates producing paralytic shellfish poison (PSP) between 1970 and 2005 (Anderson, 2009).

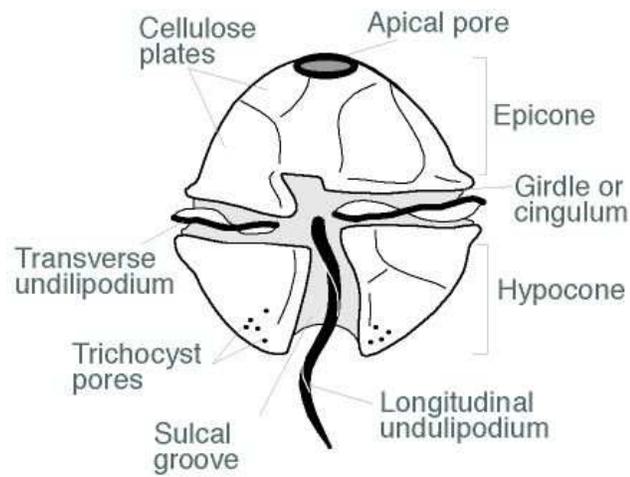


Figura 5. Representación esquemática de un dinoflagelado tipo (Tomas, 1996).

Figure 5. Schematic representation of a type dinoflagellate (Tomas, 1996).

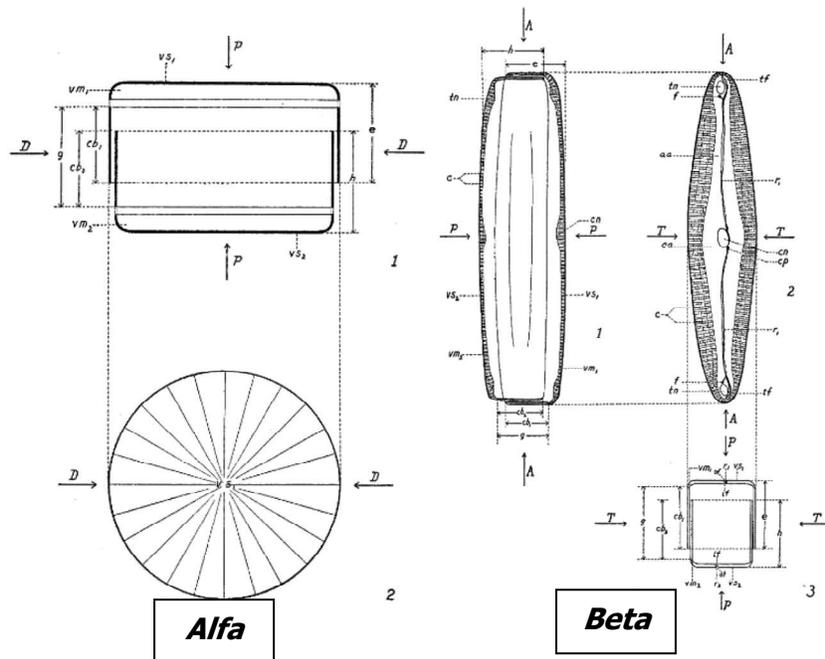


Figura 6. Representación esquemática de una frústula de diatomea (Cupp, 1943).

Figure 6. Representación schematic of a diatom frustule (Cupp, 1943).

Figura 6 Alfa. Representación esquemática de una frústula de diatomea del tipo céntrica (Cupp, 1943).

Figure 5 Alfa. Schematic representation of a diatom frustules of central type (Cupp, 1943).

Figura 6 Beta. Representación esquemática de una frústula de diatomea del tipo pennada (Cupp, 1943).

Figure 5 Beta. Schematic representation of a diatom frustules of pennate type (Cupp, 1943).

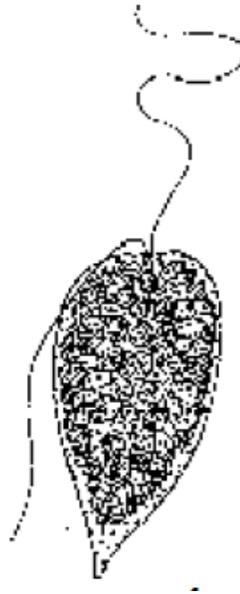


Figura 7. Representación esquemática de una microalga rafidofita marina tipo (Sar *et al.*, 2002).

Figure 7.Schematic representation of a marine microalga type rafidofita (Sar *et al.*, 2002).

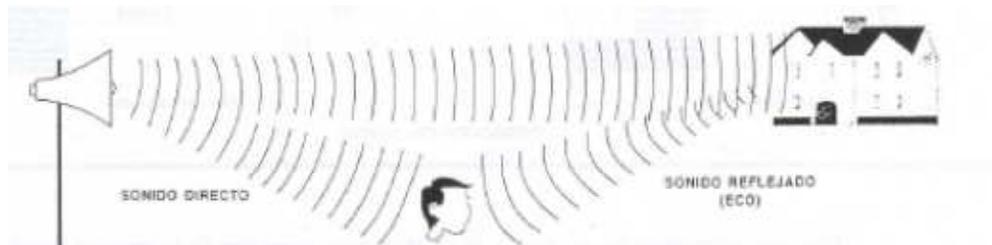


Figura 8.Representación esquemática de la vibración del aire causada por una bocina
(Alonso y Finn,1987).

Figure 8.Schematic representation of the vibration of air caused by a horn (Alonso y Finn, 1987).

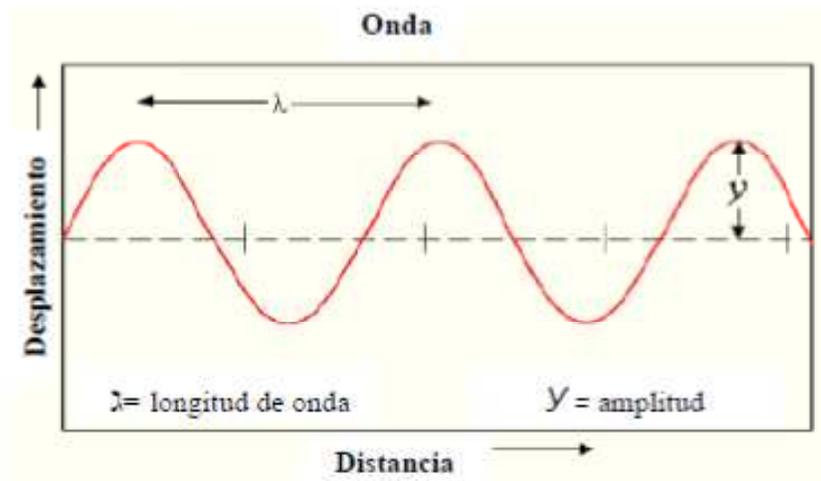


Figura 9. Esquema de una onda tipo en función de la longitud (Serway, 1997).

Figure 9. Diagram of a type wave function of the length. (Serway, 1997).

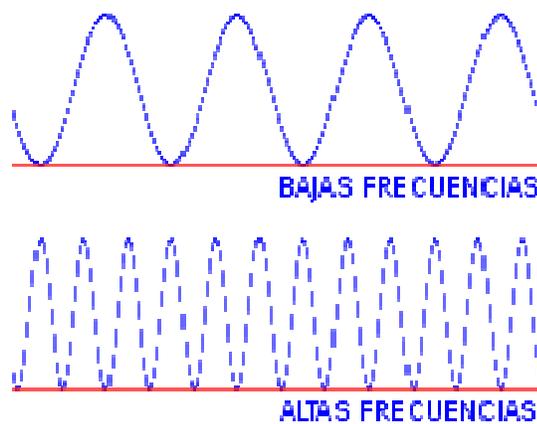


Figura 10. Representación esquemática de bajas y altas frecuencias (Alonso y Finn, 1987).

Figure 10. Schematic representation of low and high frequencies (Alonso y Finn, 1987).

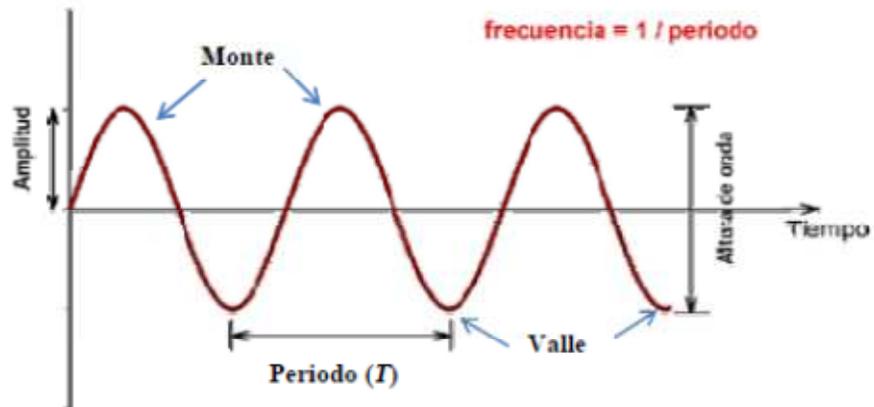


Figura 11. Esquema de una onda tipo en función del tiempo (Serway, 1997).

Figure 11. Diagram of a type wave function of time. (Serway, 1997).

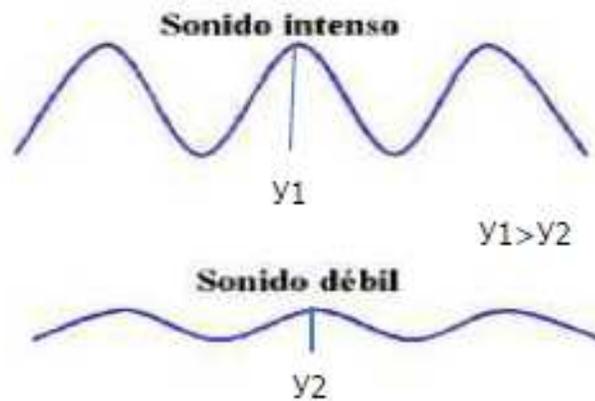


Figura 12. Representación esquemática de la intensidad del sonido (Alonso y Finn, 1987).

Figure 12. Schematic representation of sound intensity (Alonso y Finn, 1987).



Figura 13. Representación esquemática de una onda esférica (Marín, 2009).

Figure 13. Schematic representation of a spherical wave (Marín, 2009).

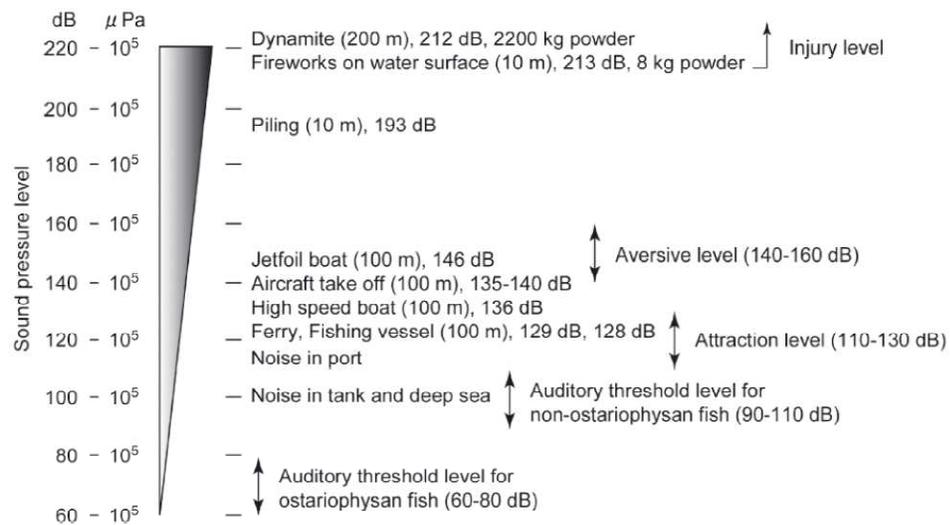


Figura 14. Nivel de presión sonora bajo el agua para diferentes fuentes emisoras (Yan *et al.*, 2010).

Figure 14. Underwater sound pressure levels of various types of sound sources (Yan *et al.*, 2010).

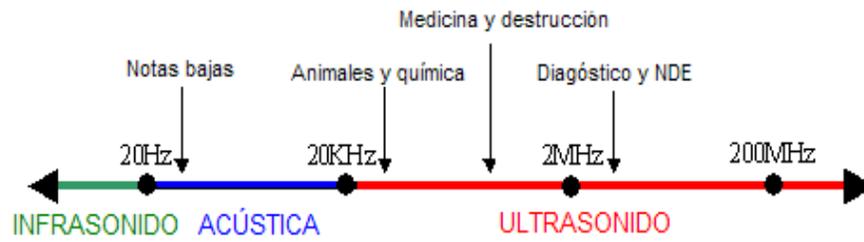


Figura 15. Clasificación de sonido según su frecuencia (Alonso y Finn, 1987).

Figure 15. Classification of sound by frequency (Alonso y Finn, 1987)

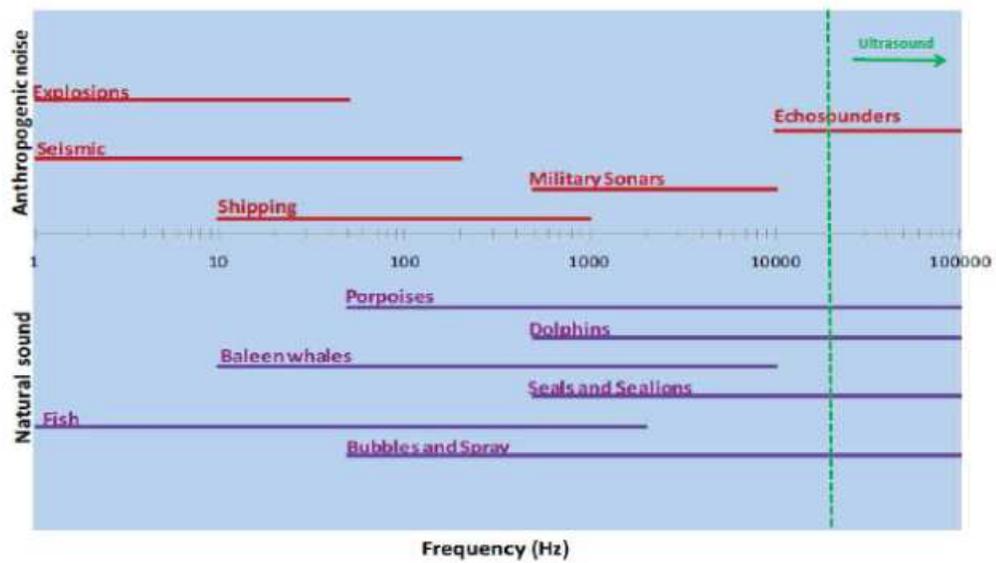


Figura 16. Fuentes naturales y antropogénicas de sonido en el mar (Popper y Ketten, 2008).

Figure 16. Natural and anthropogenic sources of sound in the sea (Popper and Ketten, 2008).

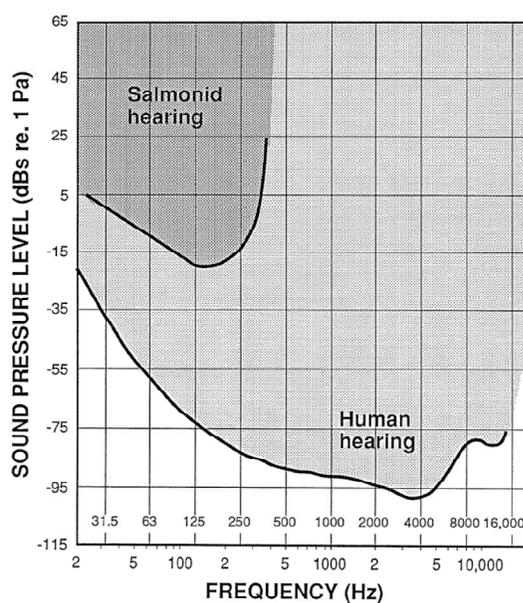


Figura 17. Comparación de la sensibilidad al sonido entre *Salmo salar* y los humanos (Hawkins and Johnstone, 1978).

Figure 17. Comparison of *Salmo salar* and human sensitivity to sound (Hawkins and Johnstone, 1978).

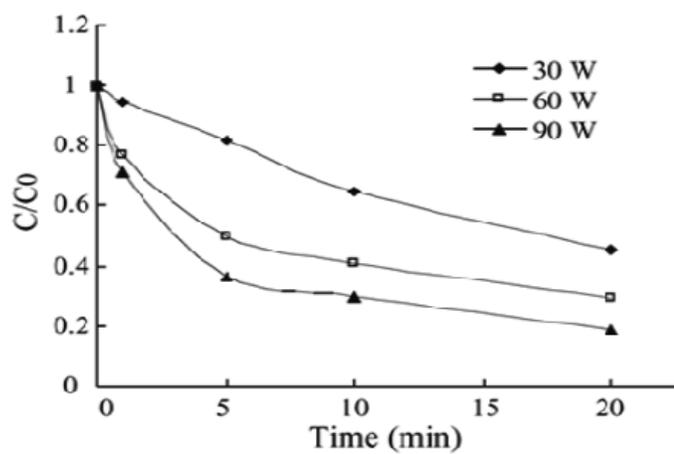


Figura 18. Remoción de *Microcystis aeruginosa* a distintas potencias y tiempos de exposición a ondas ultrasónicas de 20 KHz (Zhang *et al.*, 2009). C_0 = cel ml^{-1} en t_0 ; C = cel ml^{-1} en t_n .

Figure 18. Removal of *Microcystis aeruginosa* to different powers and exposure times of 20 kHz ultrasonic waves (Zhang *et al.*, 2009). C_0 = cel ml^{-1} in t_0 ; C = cel ml^{-1} in t_n .

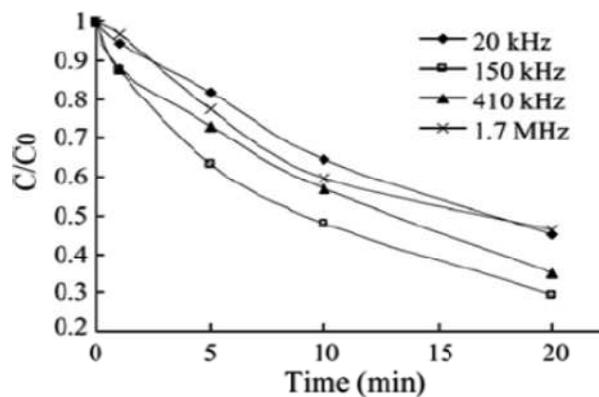


Figura 19. Remoción de *Microcystis aeruginosa* a distintas frecuencias y tiempos de exposición a ondas ultrasónicas de 30W (Zhang *et al.*, 2009). $C_0 = \text{cel ml}^{-1}$ en t_0 ; $C = \text{cel ml}^{-1}$ en t_n .

Figure 19. Removal of *Microcystis aeruginosa* at different frequencies and times of exposure to ultrasonic waves 30W (Zhang *et al.*, 2009). $C_0 = \text{cel ml}^{-1}$ in t_0 ; $C = \text{cel ml}^{-1}$ in t_n .

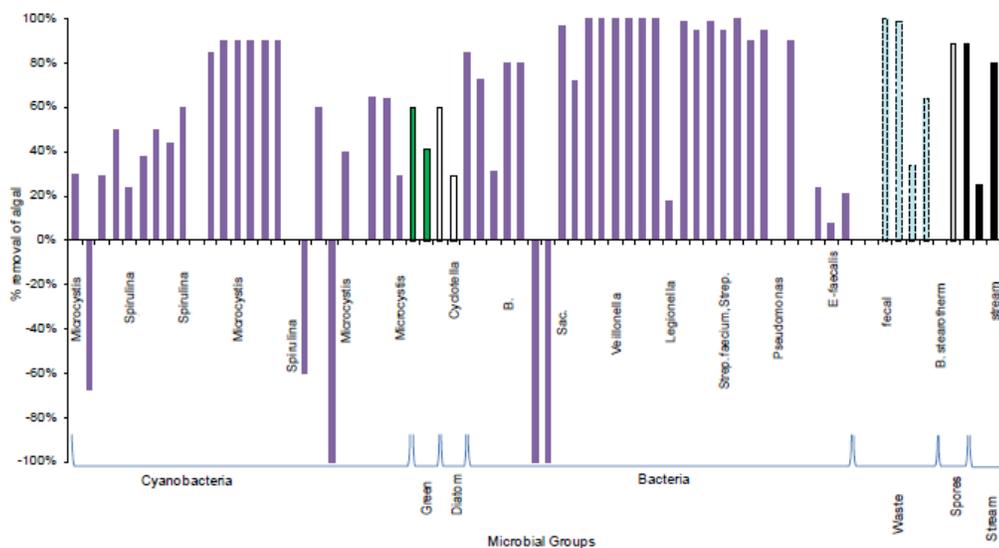


Figura 20. Porcentajes de remoción obtenidos post aplicación de ultrasonido en los distintos grupos de bacterias y microalgas estudiados a la fecha (Purcell, 2009).

Figure 20. Removal percentages obtained after application of ultrasound in different groups of bacteria and microalgae studied to date (Purcell, 2009).



Figura 21. Incubación de las cepas en tubos de ensayo.

Figure 21. Incubation of strains in test tubes.



Figura 22. Montaje realizado para el conteo de la concentración celular.

Figure 22. Mount made for counting of cell concentration.

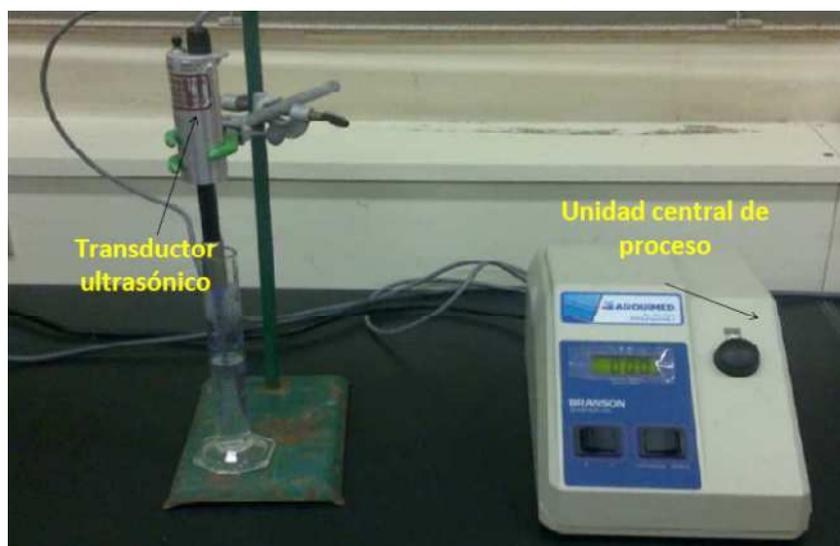


Figura 23. Montaje realizado para los tratamientos de ultrasonido.

Figure 23. Mount made for ultrasound treatments.



Figura 24. Disposición de los cultivos madre para cada cepa seleccionada.

Figure 24. Arrangement of stock cultures for each strain selected.

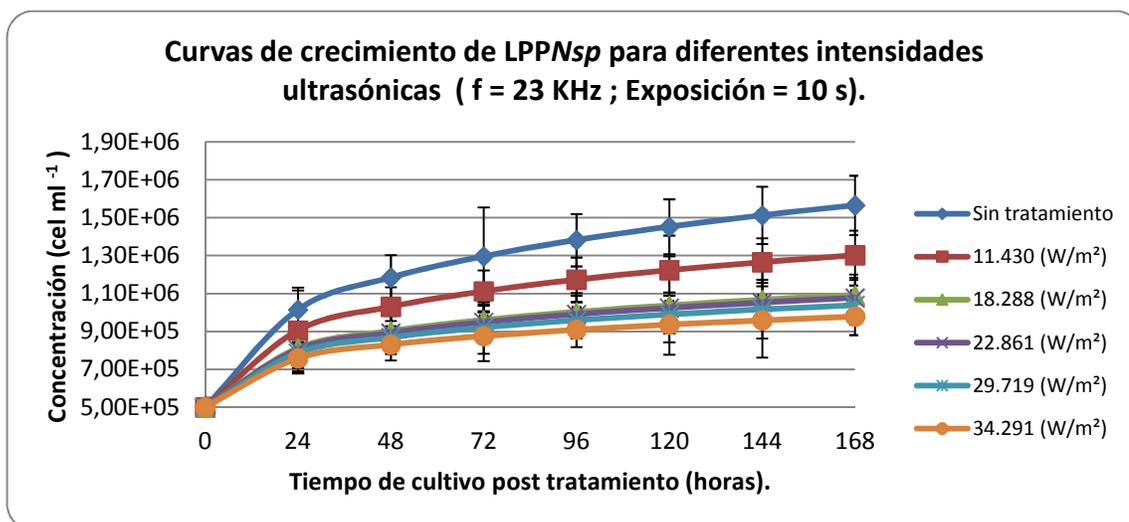


Figura 25. Curvas de crecimiento de *Nitzschia* sp. para tratamiento patrón; 11.430 W/m²; 18.288 W/m²; 22.861 W/m²; 29.719 W/m² y 34.291 W/m².

Figure 25. Growth curves of *Nitzschia* sp. standard treatment; 11,430 W/m²; 18,288 W/m²; 22,861 W/m²; 29,719 W/m² and 34,291 W m².

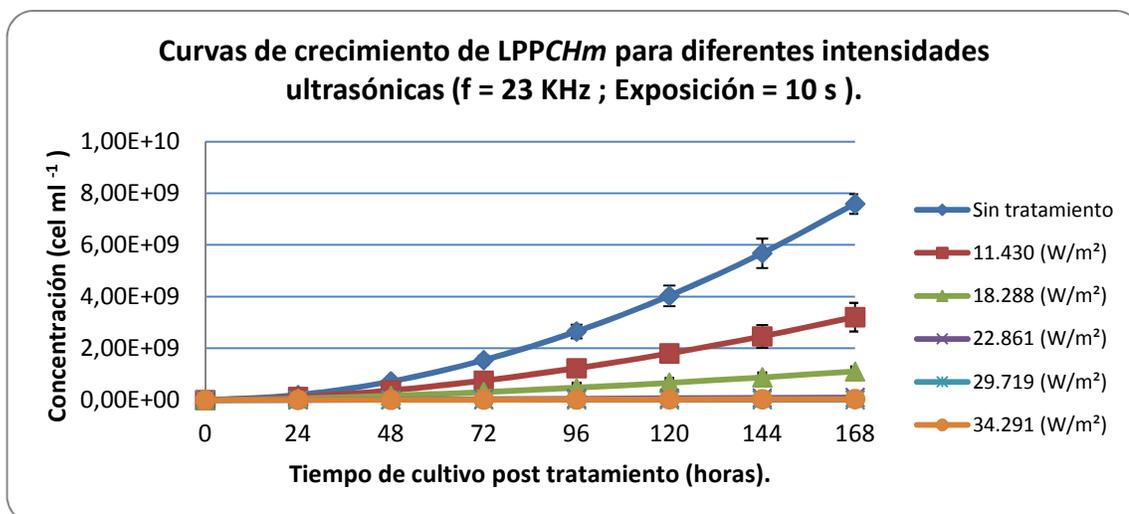


Figura 26. Curvas de crecimiento de *Chaetoceros muellerii* para tratamiento patrón; 11.430 W/m²; 18.288 W/m²; 22.861 W/m²; 29.719 W/m² y 34.291 W/m².

Figure 26. Growth curves of *Chaetoceros muellerii* to standard treatment; 11,430 W/m²; 18,288 W/m²; 22,861 W/m²; 29,719 W/m² and 34,291 W/m².

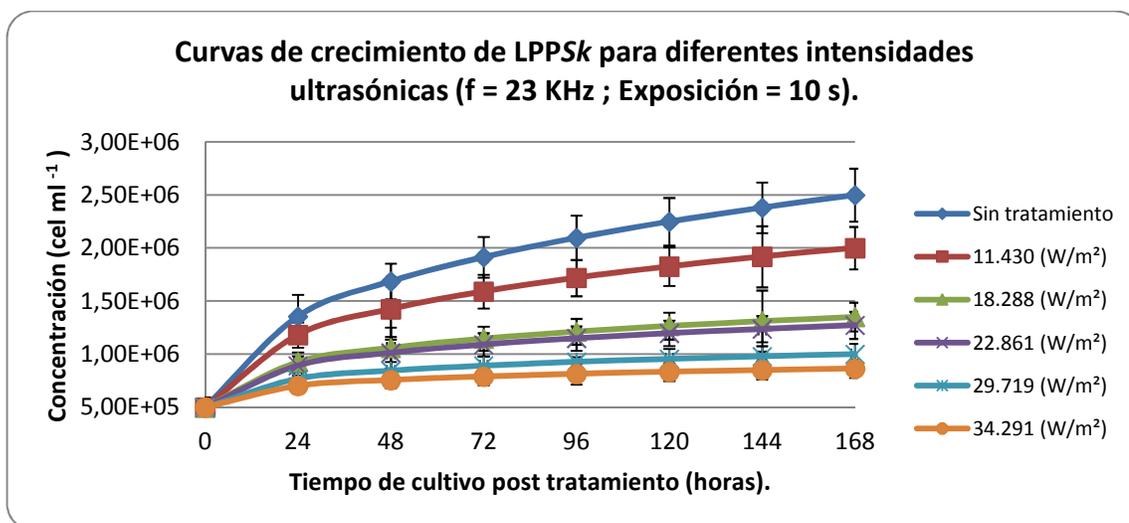


Figura 27. Curvas de crecimiento de *Skeletonema costatum* para tratamiento patrón; 11.430 W/m²; 18.288 W/m²; 22.861 W/m²; 29.719 W/m² y 34.291 W/m².

Figure 27. Growth curves of *Skeletonema costatum* to standard treatment; 11,430 W/m²; 18,288 W/m²; 22,861 W/m²; 29,719 W m² and 34,291 W/m².

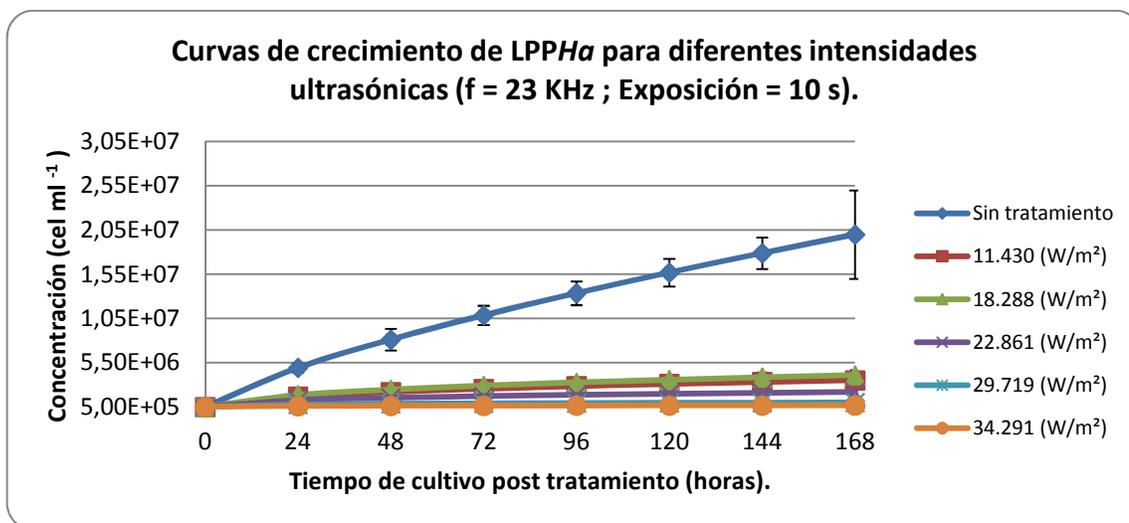


Figura 28. Curvas de crecimiento de *Heterosigma akashiwo* para tratamiento patrón; 11.430 W/m²; 18.288 W/m²; 22.861 W/m²; 29.719 W/m² y 34.291 W/m².

Figure 28. Growth curves of *Heterosigma akashiwo* to standard treatment; 11,430 W/m²; 18,288 W/m²; 22,861 W/m²; 29,719 W/m² and 34,291 W m².

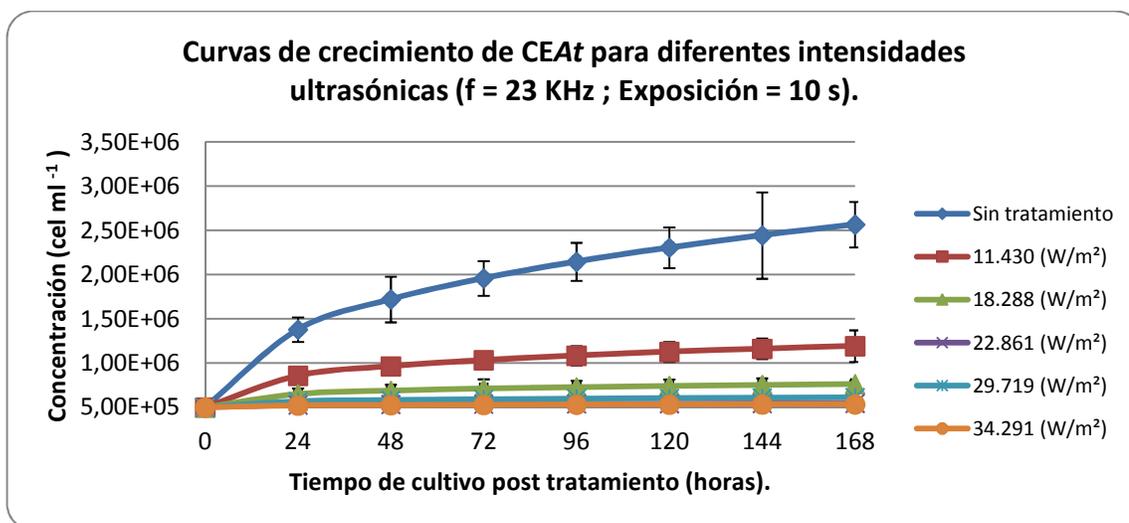


Figura 29. Curvas de crecimiento de *Alexandrium sp* para tratamiento patrón; 11.430 W/m²; 18.288 W/m²; 22.861 W/m²; 29.719 W/m² y 34.291 W/m².

Figure 29. Growth curves of *Alexandrium sp* to standard treatment; 11,430 W/m²; 18,288 W/m²; 22,861 W/m²; 29,719 W/m² and 34,291 W/m².

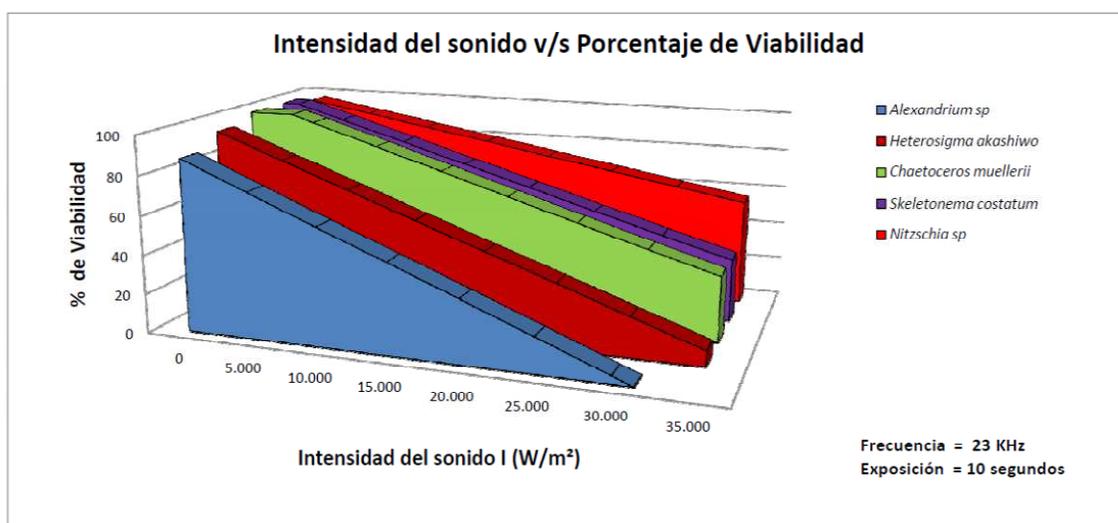


Figura 30. Efecto de la intensidad del sonido en el porcentaje de viabilidad celular para *Alexandrium sp*, *Chaetoceros muellerii*, *Heterosigma akashiwo*, *Nitzschia sp.* y *Skeletonema costatum* a 23 KHz de frecuencia y 10 segundos de exposición.

Figure 30. Effect of sound intensity in the percentage of cell viability for *Alexandrium sp*, *Chaetoceros muellerii*, *Heterosigma akashiwo*, *Nitzschia sp.* and *Skeletonema costatum* at 23 KHz and 10 seconds of exposure.

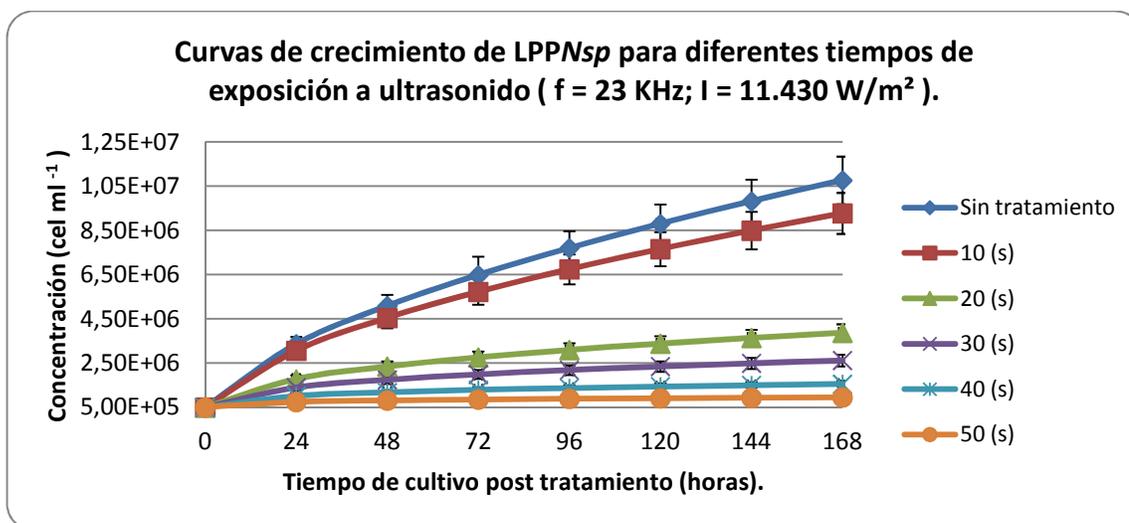


Figura 31. Curvas de crecimiento de *Nitzschia* sp. para tratamiento patrón; 10 s; 20 s; 30 s; 40 s y 50 s.

Figure 31. Curvas growth *Nitzschia* sp. standard treatment, 10 s, 20 s, 30 s, 40 s and 50 s.

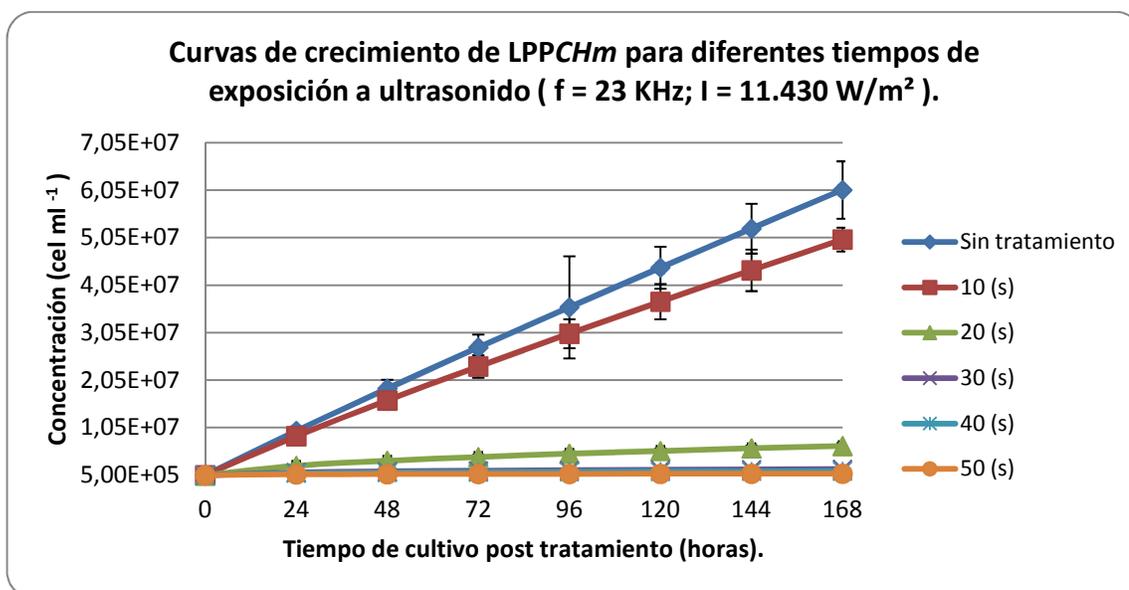


Figura 32. Curvas de crecimiento de *Chaetoceros muellerii* para tratamiento patrón; 10 s; 20 s; 30 s; 40 s y 50 s.

Figure 32. Curvas growth of *Chaetoceros muellerii* to standard treatment, 10 s, 20 s, 30 s, 40 s and 50 s.

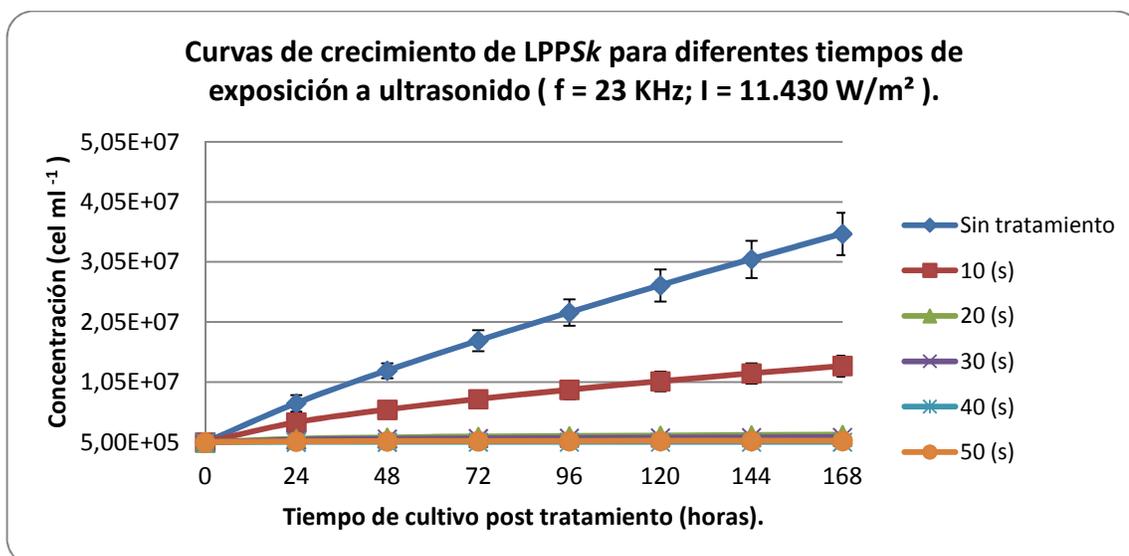


Figura 33. Curvas de crecimiento de *Skeletonema costatum* para tratamiento patrón; 10 s; 20 s; 30 s; 40 s y 50 s.

Figure 33. Curvas *Skeletonema costatum* growth to standard treatment, 10 s, 20 s, 30 s, 40 s and 50 s.

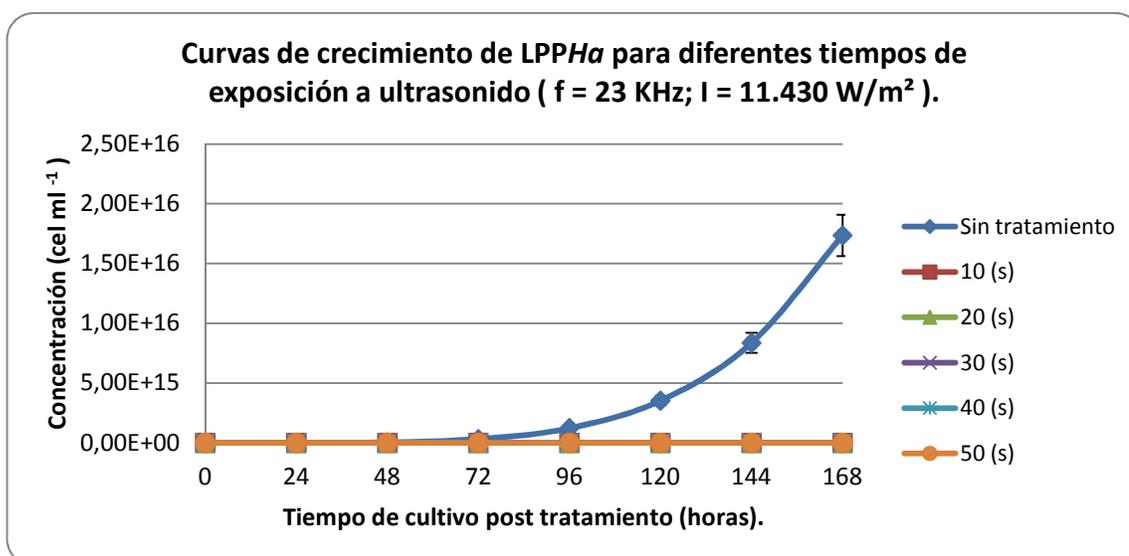


Figura 34. Curvas de crecimiento de *Heterosigma akashiwo* para tratamiento patrón; 10 s; 20 s; 30 s; 40 s y 50 s.

Figure 34. Curvas growth of *Heterosigma akashiwo* to standard treatment, 10 s, 20 s, 30 s, 40 s and 50 s.

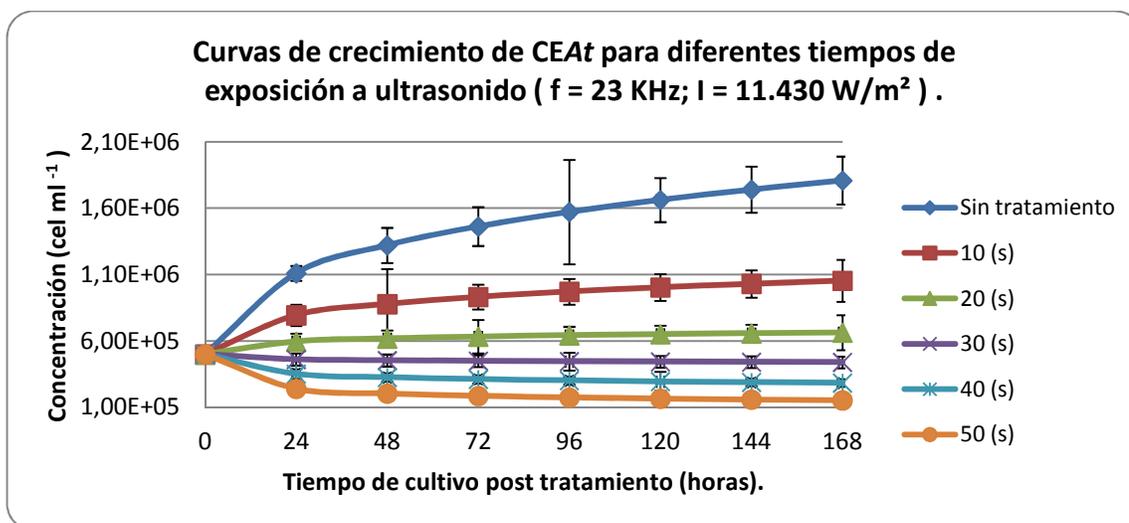


Figura 35. Curvas de crecimiento de *Alexandrium sp* para tratamiento patrón; 10 s; 20 s; 30 s; 40 s y 50 s.

Figure 35. Curvas *Alexandrium sp* growth to standard treatment, 10 s, 20 s, 30 s, 40 s and 50 s.

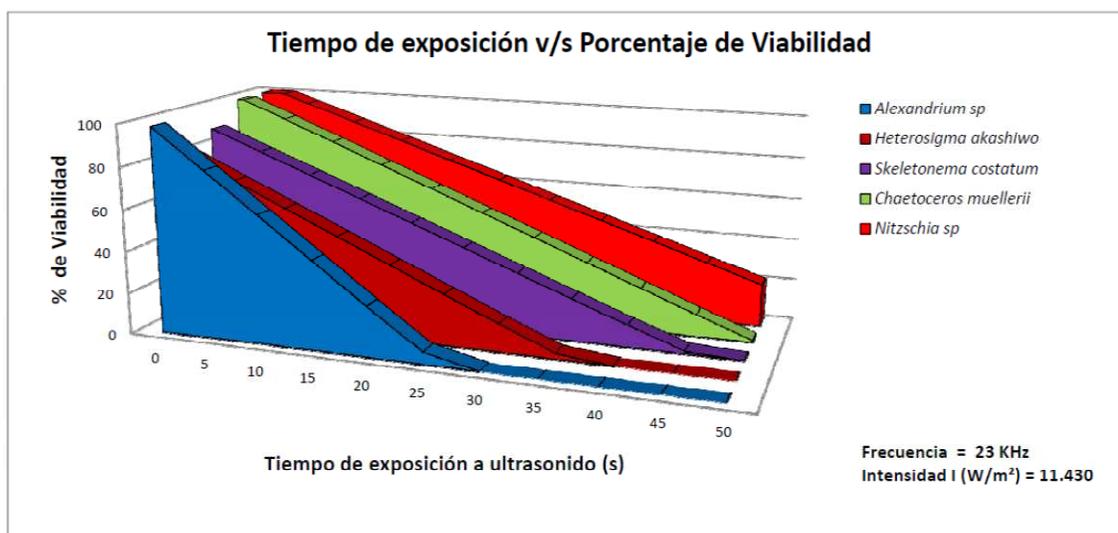


Figura 36. Efecto del tiempo de exposición a ultrasonido en el porcentaje de viabilidad celular para *Alexandrium sp*, *Chaetoceros muellerii*, *Heterosigma akashiwo*, *Nitzschia sp.* y *Skeletonema costatum* a 23 KHz de frecuencia y 11.430 W/m² de intensidad.

Figure 36. Effect of ultrasound exposure time in the percentage of cell viability for *Alexandrium sp*, *Chaetoceros muellerii*, *Heterosigma akashiwo*, *Nitzschia sp.* *Skeletonema costatum* and frequency at 23 KHz and 11 430 W / m² of intensity.

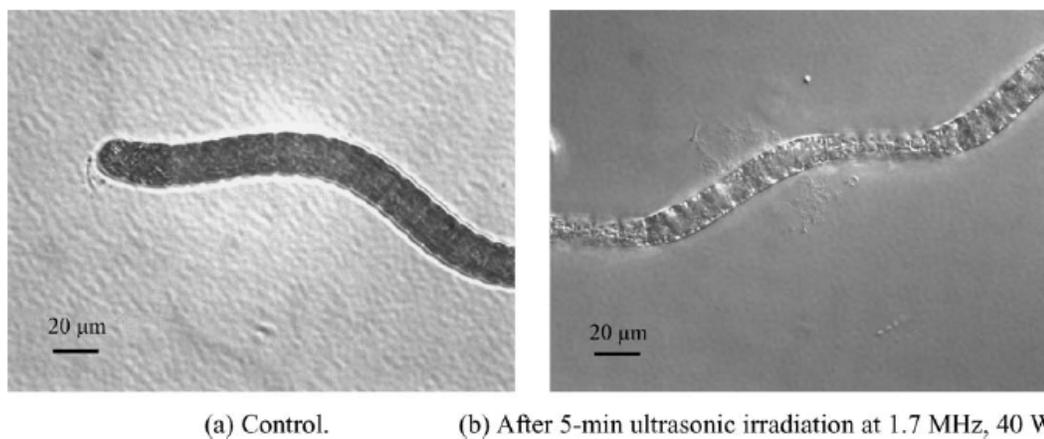


Figura 37. *Spirulina platensis* sometida a ultrasonido (Hao et al., 2004).

Figure 37. *Spirulina platensis* under ultrasonography (Hao et al., 2004).

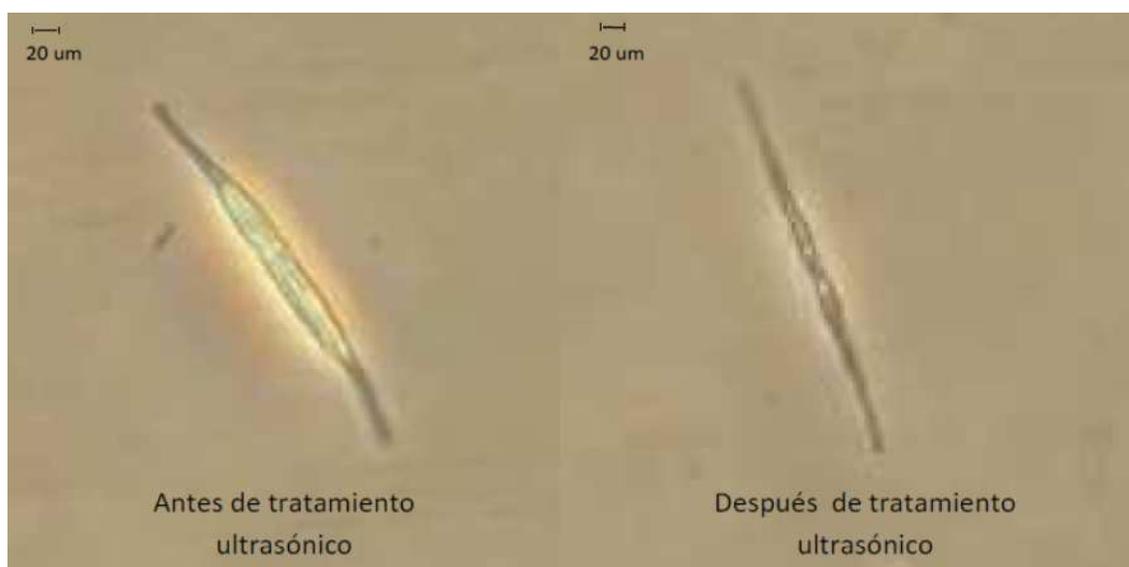


Figura 38. *Nitzschia* sp. sometida a dosis ultrasónica de 23 KHz de frecuencia, 34.291 W/m² de intensidad y 10 segundos de exposición.

Figure 38. *Nitzschia* sp. subjected to doses of 23 kHz ultrasonic frequency, 34,291 W / m² intensity and 10 seconds of exposure.



Figura 39. *Skeletonema costatum* sometida a dosis ultrasónica de 23 Khz de frecuencia, 34.291 W/m² de intensidad y 10 segundos de exposición.

Figure 39. *Skeletonema costatum* subjected to doses of 23 kHz ultrasonic frequency, 34,291 W / m² intensity and 10 seconds of exposure.

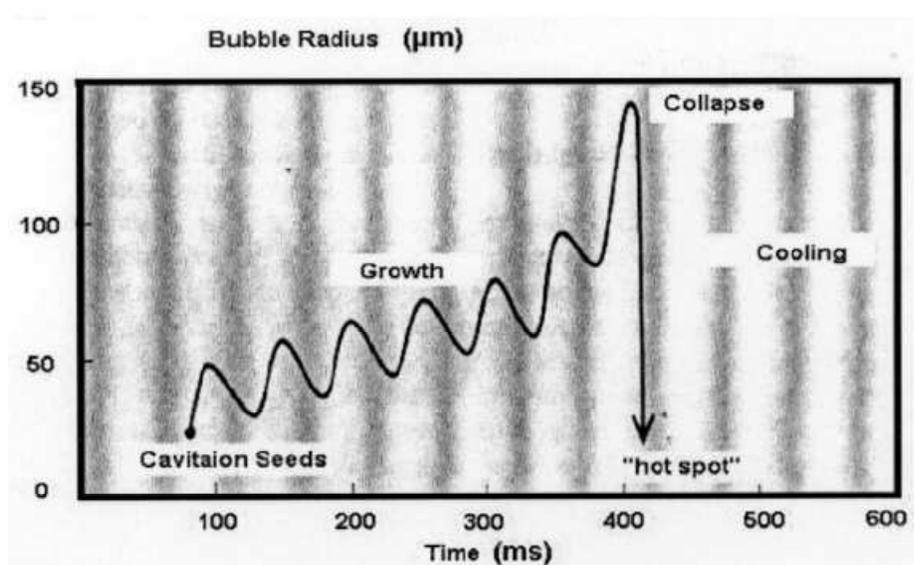


Figura 40. Fenómeno de la cavitación acústica (Dehghani y Changani, 2006).

Figure 40. Phenomenon of acoustic cavitation (Dehghani and Changani, 2006).

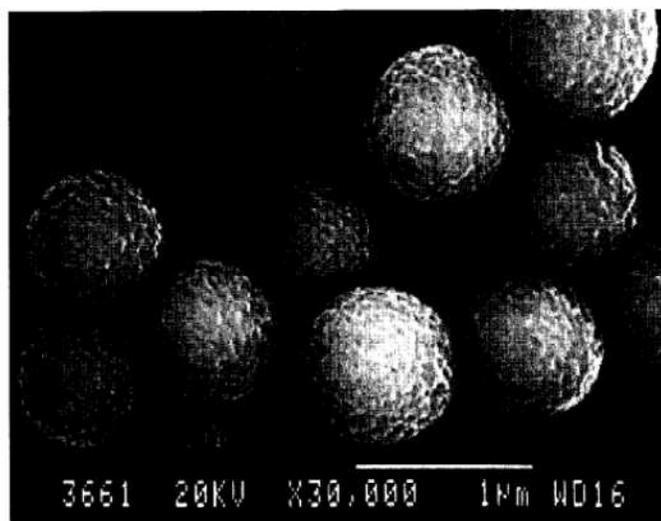


Figura 41. Burbujas de cavitación acústica (Phillips *et al.*, 1998).

Figure 41. Acoustic cavitation bubbles (Phillips *et al.*, 1998).

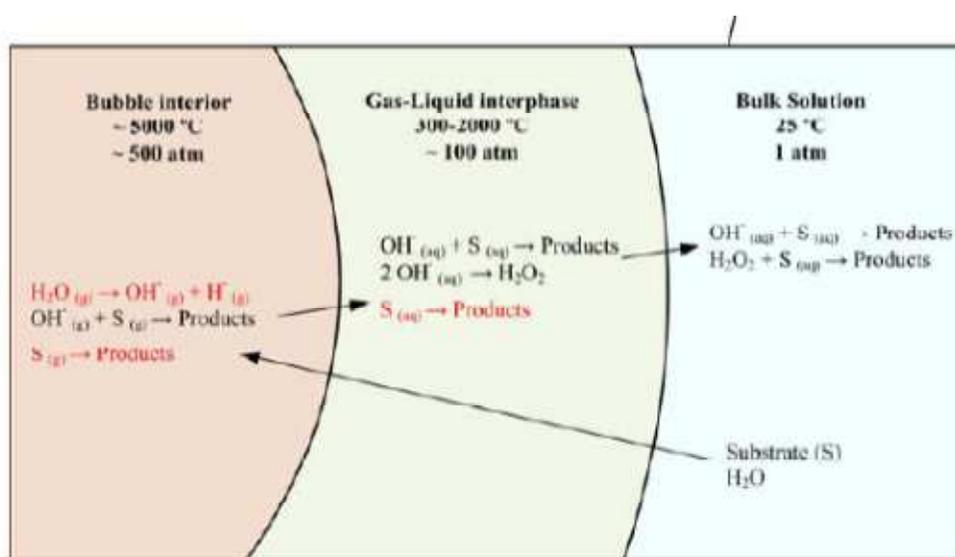


Figura 42. Representación esquemática de la formación de radicales libres y agua oxigenada en burbujas de cavitación acústica (González-García *et al.*, 2010).

Figure 42. Schematic representation of the formation of free radicals and hydrogen peroxide in acoustic cavitation bubbles (González-García *et al.*, 2010).

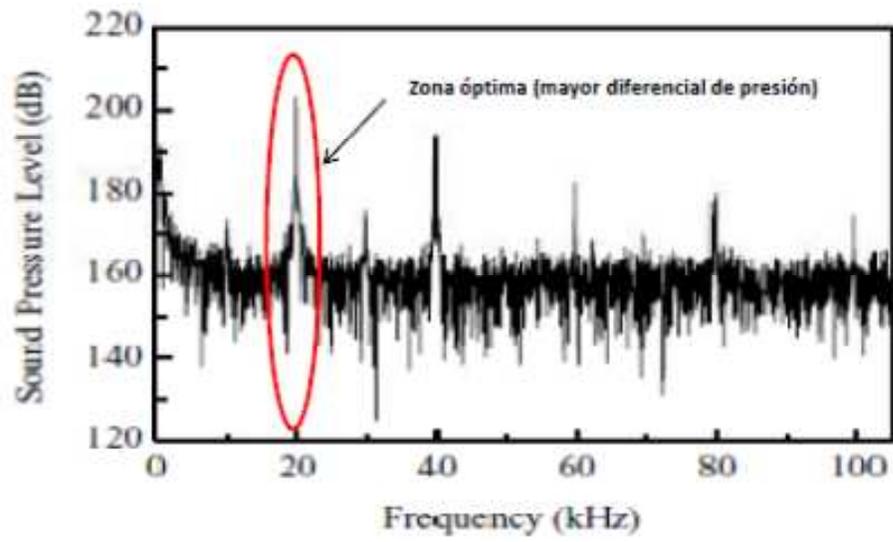


Figura 43. Nivel de presión del sonido en función de la frecuencia (Hao *et al.*, 2004).

Figure 43. Sound pressure level according to the frequency (Hao *et al.*, 2004).