

INFORME FINAL



**Proyecto FIPA 2020-08: “Validación de técnicas de inactivación de las principales Microalgas causantes de FAN”**

I N S T I T U T O D E F O M E N T O P E S Q U E R O



**INFORME FINAL**

**Proyecto FIPA 2020-08:**  
"Validación de técnica de inactivación de las  
principales microalgas causantes de FAN"  
SUBSECRETARÍA DE PESCA Y  
ACUICULTURA / Enero 2022

**REQUIRENTE**

**SUBSECRETARÍA DE PESCA Y  
ACUICULTURA**  
Subsecretaria de Pesca y Acuicultura  
Julio Salas Gutiérrez

**FONDO DE INVESTIGACIÓN PESQUERA Y  
ACUICULTURA, FIPA**  
Director ejecutivo  
Rafael Orlando Hernández Vidal

**EJECUTOR**  
**INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO, IFOP**  
Director Ejecutivo  
Gonzalo Pereira Puchy

**Jefe División Investigación en Acuicultura**  
Leonardo Guzmán Méndez

**JEFE PROYECTO**  
Jorge Mardones Sánchez

**EQUIPO DE TRABAJO**  
Javier Paredes Mella  
Ana Flores Leñero  
Marco Antonio Pinto Torres  
Pablo Leal Sandoval  
Luis Norambuena Subiabre  
Pablo Salgado Garrido

## 1. RESUMEN EJECUTIVO

Avanza en el entendimiento de los procesos involucrados en la inactivación de las principales especies de microalgas causantes de Floraciones Algales Nocivas (FAN) en Chile es una prioridad para plantear una estrategia fundamentada de mitigación para los problemas generados por este tipo de eventos. Actualmente, Chile cuenta escasas normativas o planes de acción que aborden esta problemática de forma sistemática, lo que ha resultado en grandes pérdidas económicas para la industria acuícola local en las últimas dos décadas. Las recientes anomalías climáticas registradas en 2016 (El Niño Godzilla) y 2021 (La Niña) estuvieron acompañadas de importantes déficits en pluviosidad, lo cual tuvo un importante potencial efecto en las masivas floraciones de la dictiófita *Pseudochattonella verruculosa* y la rafidoficea *Heterosigma akashiwo*, respectivamente. En ambos casos, las medidas de mitigación ejecutadas durante estos eventos mostraron una baja eficiencia, sobre todo aquellas de mayor uso en la industria, como lo son las cortinas de burbujas. A pesar de la imperante necesidad de estar preparados logísticamente para enfrentar un evento de FANs, son muy pocos los estudios científicos conclusivos que muestran la efectividad de estas metodologías. La gran mayoría de los reportes corresponden a observaciones de campo con poco respaldo científico significativo. Es muy probable que por este motivo exista un escaso progreso en la investigación e implementación de normativas y/o regulaciones que permitan ejecutar de manera eficiente estas metodologías de mitigación a gran escala en diferentes países del mundo. El objetivo del presente estudio es generar información de carácter teórico, práctico y experimental, que permita conocer y sugerir cuales serían las mejores alternativas de mitigación para nuestra realidad local en Chile. Se considerarán las condiciones geográficas y oceanográficas locales, así como también, las características de las principales especies de microalgas que afectan a nuestro país, especialmente en aquellas que tienen potencial tóxico con los humanos y/o las ictiotóxicas (tóxicas para peces). Para esto, se realizarán actividades de investigación bibliográfica, experimental y de muestreo, junto con la implementación y evaluación de las principales y más

prometedoras técnicas de mitigación actualmente disponibles.

En el primer informe de avance del proyecto FIPA 2020-08 “Evaluación de técnicas de mitigación y/o inactivación celular de las principales microalgas causantes de FAN”, se logró generar información relevante y alcanzar importantes hitos en el marco de los distintos objetivos propuestos como se indican a continuación: 1) análisis de la información bibliográfica recopilada y sistematizada; 2) la creación de fichas tipo resumen para los principales métodos de mitigación FAN existentes; 3) puesta en marcha de técnicas de análisis de viabilidad celular por fluorescencia (foto-fisiología) y tinciones celulares; 4) determinación de umbrales de detección para técnica de fluorescencia de altas tasas de repetición (sensibilidad del sensor FRRf3); 5) campaña de terreno de levantamiento de información en un centro de cultivo de salmones durante uno de los eventos FAN (Centro Caleta Soledad, CERMAQ) más significativos de los últimos años, realizando una caracterización oceanográfica y biológica de una floración de *H. akashiwo* en el fiordo Comau, junto con la evaluación de la efectividad de las cortinas de burbujas frente a esta floración, y 6) presentación de resultados preliminares en el XL Congreso de Ciencias del mar de la Sociedad Chilena de Ciencias del Mar. Además, se presentó un avance respecto al cronograma global de actividades, resultados preliminares de algunos experimentos de mitigación *in vitro*, y la habilitación de un repositorio de artículos científicos que forman parte de la confección de fichas técnicas de los principales métodos de mitigación de FANs existentes actualmente.

En el segundo informe de avance, que corresponde al objetivo 2 de este informe, se logró determinar la efectividad del peróxido de hidrógeno y el dióxido de cloro como medidas de mitigación en sistemas cerrados y de arcillas modificadas provenientes de China como potencial agente mitigante en sistemas abiertos. Además, se presenta como resultado preliminar el efecto citotóxico/alelopático de macroalgas locales (ej., pelillo – *Agarophyton chilense*) en la viabilidad celular de microalgas tóxicas. Este resultado abre una nueva ventana en la investigación de medidas de mitigación de FANs desde una mirada sustentable y con nulo impacto en el sistema acuático de los fiordos del sur de Chile.

El informe pre-final presentó resultados preliminares de los objetivos 3 y 4. En el

objetivo 3 se realizó un análisis de las normas internacionales acerca del uso de diferentes sistemas de mitigación de FANs, así como también se describieron los factores de riesgo para el medioambiente debido a la potencial liberación de sub-productos nocivos. Los resultados mostraron que existen muy pocos estudios científicos que avalen el uso de estas metodologías para la mitigación de FANs. Los métodos químicos son los más estudiados y regulados, pero su uso ha sido principalmente para inactivar virus y bacterias, y en baja medida para inactivar cianobacterias en sistemas continentales para uso de agua potable. Las arcillas modificadas solo han sido descritas de forma más específica en China, pero los efectos deletéreos en el medioambiente han sido poco abordados. El caso más interesante son las cortinas de burbujas utilizadas en la salmonicultura local. A pesar de que son el sistema de mitigación de FANs más usado en Chile, no existe oficialmente una norma que las regule, y no existen estudios científicos que demuestren su efectividad frente a floraciones de microalgas ictiotóxicas. Preliminarmente, los resultados del objetivo 4 mostraron que la mitigación de FANs por medio de agentes químicos-físicos son especies-dependiente. Así, algunos agentes mitigantes, como las arcillas modificadas y el peróxido de hidrogeno, pueden generar inactivación de las especies FANs a diferentes concentraciones de exposición. Adicionalmente, la aplicación de estos biocidas puede en algunas ocasiones potenciar los efectos citotóxicos o en otras disminuirlos. Por otro lado, se hace necesario incorporar evaluaciones a nivel de uso real ya que los experimentos realizados en laboratorio muchas veces no incluyen importantes variables que se presentan en terreno.

Finalmente, este informe final complementa los objetivos 3 y 4, y sintetiza toda la información experimental desarrollada durante el proyecto. Mediante reuniones con la autoridad marítima, SUBPESCA y SERNAPESCA se logró determinar brechas en los procesos de selección de métodos de mitigación de FANs en nuestro país y a partir de los resultados obtenidos en este proyecto se realizó un ranking de los sistemas de mitigación más efectivos y aplicables según las condiciones ambientales y de acuicultura en los fiordos Patagónicos.

## 2. ABSTRACT

Advancing in the understanding of the processes involved in the inactivation of the main species of microalgae that cause Harmful Algal Blooms (HAB) in Chile is a priority to propose a well-founded mitigation strategy for the problems caused by this type of event. Currently, Chile has few regulations or action plans that address this problem in a systematic way, which has resulted in great economic losses for the local aquaculture industry in the last two decades. The recent climatic anomalies recorded in 2016 (El Niño Godzilla) and 2021 (La Niña) were accompanied by significant deficits in rainfall, which had a significant potential effect on the massive blooms of the dictyophyte *Pseudochattonella verruculosa* and the raphidophyte *Heterosigma akashiwo*, respectively. In both cases, the mitigation strategies implemented during these events showed low efficiency, especially those most widely used in the industry, such as bubble curtains. Despite the prevailing need to be logistically prepared to face a HAB event, there are very few conclusive scientific studies that show the effectiveness of these methodologies. Most reports correspond to field observations with insignificant scientific support. It is very likely that for this reason there is little progress in the research and implementation of norms and/or regulations that allow these mitigation methodologies to be efficiently executed on a large scale in different countries of the world. The objective of this study was to generate information of a theoretical, practical and experimental nature, which allows to know and suggest which would be the best HABs mitigation alternatives for our local reality in Chile. Local geographic and oceanographic conditions were considered, as well as the characteristics of the main species of microalgae that affect our country, especially those that have toxic potential to humans and/or ichthyotoxic (toxic to fish). Bibliographic, experimental, and sampling research activities were carried out, along with the evaluation of the main and most promising mitigation techniques currently available. In the first progress report of the FIPA 2020-08 project "Evaluation of cell mitigation and/or inactivation techniques for the main microalgae that cause HABs in Chilean waters", it was possible to generate relevant information and achieve important milestones within the framework of the different objectives proposed as follows: 1) State of the art; 2) Fact sheets for the main existing HAB

mitigation methods; 3) Implementation of cell viability analysis techniques by fluorescence (photo-physiology) and cell staining; 4) determination of microalgae photosynthesis thresholds using a Fast Repetition Rate Fluorescence Technique (FRRf3 sensor); 5) Evaluation of the effectiveness of bubble curtains in a salmon farm (Caleta Soledad Center, CERMAQ) during the 2021 *H. akashiwo* bloom event in the Comau Fjord and, 6) presentation of preliminary results at the XL Congress of Marine Sciences of the Chilean Society of Marine Sciences. In the second report, it was possible to determine the effectiveness of hydrogen peroxide and chlorine dioxide as mitigation methods in enclosed systems, and modified clays from China as a potential mitigating agent in open systems. In addition, the cytotoxic/allelopathic effect of local macroalgae (e.g., pelillo – *Agarophyton chilensis*) on the cell viability of toxic microalgae is presented. This result opens a new window in the investigation of HAB mitigation methods from a sustainable point of view and with no impact on the Chilean aquatic system.

The pre-final report showed preliminary results of objectives 3 and 4. In objective 3, an analysis of international standards on the use of different HAB mitigation systems was carried out. Results showed that there are very few scientific studies that support the use of some methodologies for HABs mitigation. Chemical methods are the most studied and regulated, but their use has been mainly to inactivate viruses and bacteria, and to a lesser extent to inactivate cyanobacteria in continental systems for drinking water use. Modified clays have only been described more specifically in China, but the deleterious effects on the environment have been little addressed. The most interesting case is the bubble curtains used in local salmon farming. Although they are the most widely used HAB mitigation system in Chile, there is no official standard that regulates them, and there are no scientific studies that demonstrate their effectiveness against blooms of ichthyotoxic microalgae. Preliminarily, the results presented for objective 4 showed that HAB mitigation by means of chemical-physical agents is species-dependent. Thus, some mitigating agents, such as modified clays and hydrogen peroxide, can inactivate HAB species at different exposure concentrations. Additionally, the application of these biocides can sometimes enhance the cytotoxic effects by transforming them in others. On the other hand, it is necessary to incorporate in situ pilot experiments since the experiments carried

out in the laboratory often do not include important variables that occur in the field. Finally, this final report complements objectives 3 and 4, and synthesizes all the experimental information developed during the project. Through meetings with the maritime authority, SUBPESCA and SERNAPESCA, it was possible to determine gaps in the selection processes of HAB mitigation methods in our country. Additionally, based on the results obtained in this project, a ranking of the most effective and applicable mitigation systems was made according to environmental and aquaculture conditions in the Patagonian fjords.

<b>A.</b>	<b>RESUMEN EJECUTIVO.....</b>	<b>iii</b>
<b>B.</b>	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vi</b>
<b>1</b>	<b>ÍNDICE GENERAL.....</b>	<b>ix</b>
<b>2</b>	<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>x</b>
<b>3</b>	<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>4</b>	<b>ÍNDICE DE FICHAS.....</b>	<b>xviii</b>
<b>5</b>	<b>ÍNDICE DE ANEXOS.....</b>	<b>xix</b>
	<b>ÍNDICE GENERAL</b>	
<b>6</b>	<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>1</b>
6.1.	Sistemas de mitigación de FANs en sistemas cerrados.....	2
6.2.	Sistemas de mitigación de FANs en sistemas abiertos.....	5
6.3.	<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>8</b>
6.4.	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>8</b>
<b>7</b>	<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>10</b>
7.1.	Recopilación de información.....	10
7.2.	Confección de Fichas.....	11
7.3.	Comparación sistemas de mitigación.....	11
7.4.	Selección de sistemas.....	11
7.5.	Sistematización de normativa.....	12
7.6.	Cultivo y mantenimiento de microalgas tóxicas.....	12
7.6.1.	Análisis previo de los umbrales de detección de las técnicas propuestas	12
7.6.2.	Medición de fotosíntesis mediante fluorescencia de altas tasas de repetición (FRRF) .....	13
7.6.3.	Evaluación de la viabilidad celular con rojo neutro.....	13
7.6.4.	Evaluación de la viabilidad celular con FDA.....	14
7.7.	Cultivo y mantenimiento de líneas celulares branquiales RTgill-W1.....	14
7.8.	Experimento con líneas celulares de RT gill-W1.....	17
7.9.	Experimentos para sistemas cerrados.....	18
7.9.1.	Peróxido de hidrogeno.....	19
7.9.2.	Dióxido de cloro.....	23
7.9.3.	Radiación ultravioleta (UV) .....	25
8.1.	Sistemas de mitigación abiertos.....	27
8.1.1.	Arcillas.....	27
8.1.2.	Macroalgas.....	31
8.1.3.	Cortina de Burbujas.....	34
<b>9</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
9.1.	Objetivo 1.....	40
9.1.1.	Confección de fichas.....	40
9.1.2.	Patentes.....	46

9.1.3.	Sistemas de mitigación.....	59
9.1.4.	Fichas.....	61
9.1.5.	Comparación entre sistema de mitigación.....	93
9.1.6.	Selección de sistemas de mitigación.....	97
9.1.7.	Sistematización de normativa.....	99
9.2.	Objetivo 2.....	106
9.2.2.	Mitigación para sistemas cerrados.....	108
9.2.2.1.	Peróxido de hidrógeno.....	108
9.2.2.2.	Dióxido de cloro.....	126
9.2.2.3.	Sistema Ultravioleta (UV) y wellboats.....	129
9.2.3.	Métodos de mitigación para sistemas naturales (abiertos).....	136
9.2.3.1.	Arcillas modificadas.....	136
9.2.3.2.	Macroalgas.....	165
9.2.3.3.	Cortinas de burbujas.....	171
9.2.4.	Principales resultados experimentales.....	178
9.3.	Objetivo 3.....	179
9.3.1	Información sobre peligrosidad de productos y normas internacionales de emisión.....	179
9.3.1.1	Peróxido de hidrógeno.....	180
9.3.1.2	Dióxido de cloro.....	184
9.3.1.3	Radiación UV.....	188
9.3.1.4	Arcillas modificadas.....	190
9.3.1.5	Cortinas de burbujas y IMTA.....	193
9.3.2	Bioensayos con sistemas de eliminación provisorios.....	193
9.4.	Objetivo 4.....	196
<b>10</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>207</b>

## ÍNDICE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Listado completo de patentes encontradas y analizadas, para distinguir al país de origen se debe prestar atención a las primeras dos letras del código de cada patente. AU = Australia; CN = China; EP = Europa; ES = España; JP = Japón; KR= Corea; RU= Rusia;US = Estados Unidos. Como referencia en la última columna está el año en el cual la patente fue concedida al solicitante....	48
<b>Tabla 2.</b>	Lista resumen de los sistemas de mitigación de especies FANs.....	60
<b>Tabla 3.</b>	Resumen especificaciones técnicas sobre cortinas de burbujas ofrecidas por proveedores chilenos .....	69
<b>Tabla 4.</b>	Comparación de sistemas para <i>Alexandrium catenella</i> (Ac) .....	95
<b>Tabla 5.</b>	Comparación de sistemas para <i>Karenia selliformis</i> (Ks) .....	96
<b>Tabla 6.</b>	Comparación de sistemas para <i>Pseudochattonella verruculosa</i> (Pv) .....	97
<b>Tabla 7.</b>	Muestra lista especies incluidas en el monitoreo preventivo. ....	104
<b>Tabla 8.</b>	Sistemas de inactivación validados en condiciones controladas de laboratorio. ....	105
<b>Tabla 9.</b>	Sistemas de inactivación validados en condiciones reales a bordo de wellboat. ....	105
<b>Tabla 10.</b>	Principales de los resultados de las diferentes mitigaciones analizadas. ....	179

<b>Tabla 11.</b>	Muestra las principales instituciones y sus funciones que están relacionadas con el control, mitigación, y prevención de los efectos nocivos de las mareas rojas .....	206
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>		
<b>Figura 1.</b>	Representación esquemática de los parámetros de fluorescencia medidos. Adaptación de Salazar et al. 2016 .....	14
<b>Figura 2.</b>	Imágenes de microscopia de luz de la tinción rojo neutro en <i>A. catenella</i> (Ac). (A) células de <i>A. catenella</i> (Ac) con tinción en rojo (viva) y sin tinción (muertas) a 20x. (B) Célula sin tinción (muerta) 40x. (C) Célula con tinción (viva) 40x ....	15
<b>Figura 3.</b>	Imágenes de microscopia de luz de la tinción rojo neutro en <i>K. selliformis</i> (Ks). (A) células de <i>K. selliformis</i> (Ks) teñida (viva) y sin tinción (muertas) a 20x. (B) Célula sin tinción (muerta) 40x. (C) Célula con tinción roja (viva) 40x. ....	16
<b>Figura 4.</b>	Imágenes de microscopia de luz de la tinción rojo neutro en <i>P. verruculosa</i> (Pv). (A) Células de <i>P. verruculosa</i> (Pv) teñida (viva) en 40x (B) Célula sin tinción (muerta) en 40x .....	16
<b>Figura 5.</b>	Imagen de microscopia de epifluorescencia de la tinción FDA en <i>A. catenella</i> (Ac). (A) células de <i>A. catenella</i> verde fluorescente (viva) en 10x (B) Célula color rojo (muerta) en 10x. ....	17
<b>Figura 6.</b>	Crecimiento de las líneas celulares RTgill-W1 ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ). (A) Crecimiento de las líneas celulares al día 2 de ser repicadas. (B) Crecimiento de las líneas celulares al día 4. (C) Crecimiento de las líneas celulares al día 8 .....	18
<b>Figura 7.</b>	Bio-ensayo con líneas branquiales RTgill-W1 ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) para determinar sustancias tóxicas en el medio disuelto liberado por microalgas tóxicas, además para determinar la toxicidad de los métodos de mitigación utilizados (ilustrado de Mardones et al., 2015) .....	19
<b>Figura 8.</b>	Esquema de trabajo experimental con peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) y microalgas tóxicas fitoplanctónica. Etapa 1, cultivos monoclonales. Etapa 2, desarrollo experimental con 6 concentraciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0, 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm) a dos densidades celulares (100 y 1000 céls/mL). Color azul representa el control, color amarillo 100 ppm y color verde 500 ppm de peróxido de hidrógeno). Etapa 3, validación de los datos obtenido con diversas técnicas analíticas .....	20
<b>Figura 9.</b>	Esquema de trabajo experimental con peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) y comunidad fitoplanctónica. Etapa 1, cultivos monoclonales y aclimatación del fitoplancton. Etapa 2, desarrollo de cultivos heterogéneos con abundancias en razones 1:1 (Color azul representa el control, color amarillo 100 ppm y color verde 500 ppm de peróxido de hidrógeno). Etapa 3, validación de los datos obtenido con diversas técnicas analíticas .....	22
<b>Figura 10.</b>	Esquema de trabajo experimental con peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) y mesocosmos del fiordo Comau. Etapa 1, obtención de mesocosmos. Etapa 2, Color azul representa el control, color amarillo 10 ppm y color verde 25 ppm de peróxido de hidrógeno). Etapa 3, validación de los datos obtenido con diversas técnicas analíticas. ....	23
<b>Figura 11.</b>	Esquema de trabajo experimental para dióxido de cloro (ClO <sub>2</sub> ). Etapa 1: concentraciones celulares de cultivos monoclonales (céls/mL). Etapa 2: Tratamientos utilizados - Color azul representa el control y amarillo a rojo, concentraciones experimentales utilizados (1 a 1000 ppm). Etapa 3:	24

validación de los datos obtenido con diversas técnicas.....

<b>Figura 12.</b>	Esquema de trabajo experimental para dióxido de cloro (ClO <sub>2</sub> ). Etapa 1: concentraciones celulares de cultivos monoclonales (cél/s/mL). Etapa 2: Tratamientos utilizados - Color azul representa el control y amarillo a rojo, concentraciones experimentales utilizados (1 a 1000 ppm). Etapa 3: validación de los datos obtenido con diversas técnicas FRRf y líneas celulares. ....	25
<b>Figura 13.</b>	(A) Sistema de radiación ultravioleta (UV) Atlantium's Hydro-Optic. (B) Modelo experimental de lugares donde se obtuvieron las muestras. 1) Sin UV, obtención previo al contacto con la lampara UV. 2) Con UV, obtención posterior al contacto con la lampara UV. ....	27
<b>Figura 14.</b>	Esquema de trabajo experimental para arcillas modificadas (Tipo 1 y Tipo 2). Etapa 1: concentraciones celulares cultivos monoclonales (cél/s/mL) y preparación de solución de arcillas en recipientes. Etapa 2: Tratamientos utilizados - Color azul representa el control de microalgas y amarillo, verde y naranja representan las concentraciones experimentales utilizadas (0,1 , 0,5 y 1 g/L) para cada uno de los tipos de arcillas. Etapa 3: validación de los datos obtenido con diversas técnicas de análisis. ....	28
<b>Figura 15.</b>	Esquema de trabajo experimental para arcillas modificadas (Tipo 1 y Tipo 2) y comunidad fitoplanctónica. Etapa 1, cultivos monoclonales, aclimatación del fitoplancton y preparación de solución de arcillas en recipientes. Etapa 2: Tratamientos utilizados - Color azul representa el control de microalgas y naranja, morado y rojo representan las concentraciones experimentales utilizadas (0,1 , 0,5 y 1 g/L) para cada uno de los tipos de arcillas. Etapa 3: validación de los datos obtenido con diversas técnicas de análisis. ....	30
<b>Figura 16.</b>	Esquema de trabajo experimental de mesocosmos para arcilla. Etapa 1: comunidad de fitoplancton colectado en el área del fiordo Comau (Estación Científica Huinay). Etapa 2: Tratamientos utilizados - Color blanco representa el control y rojo y amarillo, concentraciones experimentales utilizados (0,5 g/L). Etapa 3: validación de los datos obtenido con diversas técnicas. ....	31
<b>Figura 17.</b>	Esquema de trabajo experimental para compuestos alelopáticos desarrollado por macroalgas. Etapa 1: concentraciones celulares de cultivos de mesocosmos (2000 células/mL) y cultivos de macroalgas en recipientes (producción de metabolitos secundarios o exudados). Etapa 2: validación de los datos obtenido con diversas técnicas analíticas. ....	32
<b>Figura 18.</b>	Experimento de co-cultivo de macro-microalgas en un sistema de flujo continuo.(A) Esquema. (B) El sistema original. ....	34
<b>Figura 19.</b>	Esquema de trabajo experimental del co-cultivo de micro-macroalgas con flujo continuo. Etapa 1: concentraciones celulares de cultivos de 1000cél/s/mL y los cultivos de macroalgas en recipientes (producción de metabolitos secundarios o exudados). Etapa 2: validación de los datos obtenido con diversas técnicas analíticas. ....	34
<b>Figura 20.</b>	Área de estudio, centro de cultivo de salmónidos A) Caleta el Manzano (2022), B) Caleta Soledad (2021), ambos de la empresa Cermaq, Chile. ....	36

<b>Figura 21.</b>	Esquemas que representan el posicionamiento y eficiencia de las cortinas de burbujas A) vista área, B) vista vertical de la columna de agua .....	36
<b>Figura 22.</b>	El centro Caleta Soledad (A), con un sistema de cortinas de burbujas (B) y equipo FRRF3 para medir la eficiencia fotosintética de los organismos fitoplanctónicos (C) .....	37
<b>Figura 23.</b>	Visualización de las zonas de muestreo, que se realizaron en centro de salmonicultura de la empresa Cermaq .....	37
<b>Figura 24.</b>	Número de citas y publicaciones del tema “ <i>Harmful Algal Blooms</i> ” desde el año 1992. Gráfico obtenido desde Web of Science (WoS), utilizando búsqueda en tópico .....	42
<b>Figura 25.</b>	Número de publicaciones y citas del tema “ <i>Harmful Algal Blooms + Chile</i> ” desde el año 2000. Gráfico obtenido desde Web of Science (WoS), utilizando búsqueda en tópico .....	42
<b>Figura 26.</b>	Número de citas del tema “ <i>Mitigation + Harmful Algal Blooms</i> ” desde el año 1994. Gráfico obtenido desde Web of Science (WoS) .....	43
<b>Figura 27.</b>	Número de citas y publicaciones del tema “ <i>HABs Mitigation</i> ” desde el año 1999. Gráfico obtenido desde Web of Science (WoS), utilizando búsqueda en tópico .....	43
<b>Figura 28.</b>	Número de citas y publicaciones del tema “ <i>Modified Clay + Phytoplankton</i> ” desde el año 1991. Gráfico obtenido desde Web of Science (WoS), utilizando búsqueda en tópico .....	44
<b>Figura 29.</b>	Número de citas y publicaciones del tema “ <i>Modified Clay + HAB</i> ” desde el año 2010. Gráfico obtenido desde Web of Science (WoS), utilizando búsqueda en tópico .....	44
<b>Figura 30.</b>	Número de citas y publicaciones del tema “ <i>Hydrogen peroxide + HAB</i> ” desde el año 2000. Gráfico obtenido desde Web of Science (WoS), utilizando búsqueda en tópico .....	45
<b>Figura 31.</b>	Número de citas y publicaciones del tema “ <i>Chlorine dioxide + Phytoplankton</i> ” desde el año 2004. Gráfico obtenido desde Web of Science (WoS), utilizando búsqueda en tópico .....	45
<b>Figura 32.</b>	Foto de dispersión de arcillas para la supresión de una floración activa de fitoplancton ictiotóxico en Korea del Sur (fotografía de H. Kim en referencia N°. 97) .....	62
<b>Figura 33.</b>	Sistema de jaulas para cultivo de peces en océano abierto. A) modelo Sea Station, B) AquaPod y C) OCAT diseñadas por la compañía InnovaSea system .....	89
<b>Figura 34.</b>	Umbral de detección del método FRRf3 para cultivos de la especie <i>Karenia selliformis</i> a distintas concentraciones celulares en base al stock empleado en los tratamientos .....	107
<b>Figura 35.</b>	Umbral de detección del método FRRf3 para cultivos de la especie <i>Alexandrium catenella</i> a distintas concentraciones celulares en base al stock empleado en los tratamientos .....	108
<b>Figura 36.</b>	Umbral de detección del método FRRf3 para cultivos de la especie <i>Pseudochattonella verruculosa</i> a distintas concentraciones celulares en base al stock empleado en los tratamientos .....	108
<b>Figura 37.</b>	Eficiencia fotosintética de <i>A. catenella</i> (Ac), <i>K. selliformis</i> (Ks) y <i>P. verruculosa</i> (Pv) a 100 céls/mL a 25 psu y dos temperaturas 12 - 18°C, expuestos a	109

	diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno durante un periodo tiempo de 60 min.....	
<b>Figura 38.</b>	Eficiencia fotosintética de <i>A. catenella</i> (Ac), <i>K. selliformis</i> (Ks) y <i>P. verruculosa</i> (Pv) a 1000 céls/mL a 25 psu y dos temperaturas 12 - 18°C, expuestos a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno durante un periodo tiempo de 60 min .....	110
<b>Figura 39.</b>	Eficiencia fotosintética de <i>A. catenella</i> (Ac), y <i>K. selliformis</i> (Ks) a 100 céls/mL a 33 psu y dos temperaturas 12 - 18°C, expuestos a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno durante un periodo tiempo de 60 min .....	111
<b>Figura 40.</b>	Eficiencia fotosintética de <i>A. catenella</i> (Ac), <i>K. selliformis</i> (Ks) y <i>P. verruculosa</i> (Pv) a 1000 céls/mL a 33 psu y dos temperaturas 12 - 18°C, expuestos a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno durante un periodo tiempo de 60 min .....	112
<b>Figura 41.</b>	Porcentaje de la viabilidad celular de <i>Alexandrium catenella</i> luego de ser expuestas a peróxido de hidrogeno en concentraciones de 0, 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm por 60 minutos y a diferentes condiciones experimentales de temperatura (12° y 18° C), salinidad (25 y 33 PSU) y densidad celular (100 y 1000 céls/mL) .....	114
<b>Figura 42.</b>	Porcentaje de la viabilidad celular de <i>Karenia selliformis</i> luego de ser expuestas al peróxido de hidrogeno en concentraciones de 0, 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm por 60 minutos y a diferentes condiciones experimentales de temperatura (12° y 18° C), salinidad (25 y 33) y densidad celular (100 y 1000 céls/mL) .....	115
<b>Figura 43.</b>	Porcentaje de la viabilidad celular de <i>P. verruculosa</i> luego de ser expuestas al peróxido de hidrogeno en concentraciones de 0, 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm por 60 minutos y a diferentes condiciones experimentales de temperatura (12° y 18° C) y salinidad (25 y 33) .....	116
<b>Figura 44.</b>	Efecto de diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno diluido (50 a 1000 ppm) en agua de mar filtrada (0,22 µm) en la viabilidad de células branquiales (RTgill-W1) durante 120 min. Línea roja tiempo 0, línea verde 4 horas de peróxido añadido al agua de mar, línea azul 24 horas de peróxido añadido al agua de mar. Las barras representan la media y la desviación estándar de la viabilidad celular de mediciones por cuadruplicado .....	118
<b>Figura 45.</b>	Efecto de diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno diluido (50 a 1000 ppm) en agua de mar filtrada (0,22 µm) conteniendo 100 céls/mL y 1000 céls/mL de <i>K. selliformis</i> en la viabilidad de células branquiales (RTgill-W1) durante 120 min a 12 y 18 °C. Las barras representan la media y la desviación estándar de la viabilidad celular de mediciones por cuadruplicado .....	119
<b>Figura 46.</b>	Efecto de diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno diluido (0 a 1000 ppm) en agua de mar filtrada (0.45 µm) conteniendo 100 céls/mL y 1000 céls/mL de <i>A. catenella</i> en la viabilidad de células branquiales (RTgill-W1) durante 120 min a 12 y 18 °C de temperatura y a 25 y 33 de salinidad. Las barras representan la media y la desviación estándar de la viabilidad celular de mediciones por cuadruplicado .....	120

<b>Figura 47.</b>	Efecto de diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno diluido (0 a 1000 ppm) en agua de mar filtrada (0,22 µm) conteniendo 1000 céls/mL de <i>P. verruculosa</i> en la viabilidad de células branquiales (RTgill-W1) durante 120 min a 12 y 18 °C. Las barras representan la media y la desviación estándar de la viabilidad celular de mediciones por cuadruplicado .....	121
<b>Figura 48.</b>	Eficiencia fotosintética (Fv/Fm) de <i>A. catenella</i> (AC), <i>K. selliformis</i> (KS) y <i>P. verruculosa</i> (PV) con una comunidad fitoplancton (1000 céls/mL), expuestas a dos tratamientos con distintas concentraciones de peróxido de hidrogeno (0, 500 y 500 ppm) durante una hora .....	122
<b>Figura 49.</b>	Efecto del peróxido de hidrógeno sobre microalgas objetivo con fitoplacton en la viabilidad de células branquiales. Los tratamientos del químico fueron 0, 100 y 500 ppm. A una densidad celular de 1000 céls/mL de <i>A. catenella</i> (AC), <i>K. selliformis</i> (KS) y <i>P. verruculosa</i> (PV) y 1000 céls/mL de fitoplancton. Las mediciones se hicieron por cuadruplicado .....	123
<b>Figura 50.</b>	Eficiencia fotosintética (Fv/Fm) el mesocosmo del fiordo Comau expuestas a dos tratamientos con distintas concentraciones de peróxido de hidrogeno (0, 10 y 25 ppm) en dos tiempos 1 y 3 horas posterior a iniciado el experimento. Efecto del peróxido de hidrógeno en la viabilidad celular de fitoplancton. Se sometieron a 2 concentraciones del reactivo (10 y 25 ppm) se midió al tiempo 1 y 3 horas posterior a iniciar el experimento. En rojo organismos clasificados como Diatomeas y en azul organismos clasificados como Dinoflagelados .....	124
<b>Figura 51.</b>	Efecto temporal (0 a 60 min) de distintas concentraciones de dióxido de cloro en la eficiencia fotosintética de <i>K. selliformis</i> .....	125
<b>Figura 52.</b>	Efecto del dióxido de cloro a diferentes concentraciones (ppm) sobre la eficiencia fotosintética de <i>A. catenella</i> (AC), <i>K. selliformis</i> (KS) y <i>P. verruculosa</i> (PV) a diferentes tiempos de exposición (0 a 60 minutos) .....	126
<b>Figura 53.</b>	Efecto del dióxido de cloro sobre la viabilidad celular de líneas branquiales (RTgill-W1) luego de ser expuestas por dos horas a distintas concentraciones (de 1 a 10000 ppm) .....	128
<b>Figura 54.</b>	Efecto en la eficiencia fotosintética al aplicar dosis de UV en dos tubos de salida (106 y 118 mJ/cm <sup>2</sup> ) a lo largo del tiempo. Sin UV se obtuvo la muestra antes de la lampara de UV y Con UV se obtuvo posterior a la lampara .....	129
<b>Figura 55.</b>	Efecto en la viabilidad celular al aplicar dosis de UV en un tubo de salida (106 mJ/cm <sup>2</sup> ) a lo largo del tiempo. Sin UV se obtuvo la muestra antes de la lampara de UV y Con UV se obtuvo posterior a la lampara .....	130
<b>Figura 56.</b>	Efecto en la eficiencia fotosintética al aplicar dosis de UV baja (103 mJ/cm <sup>2</sup> ) y dosis de UV alta (337 mJ/cm <sup>2</sup> ) a lo largo del tiempo. Sin UV se obtuvo la muestra antes de la lampara de UV y Con UV se obtuvo posterior a la lampara. ....	131
<b>Figura 57.</b>	Efecto en la viabilidad celular al aplicar dosis de UV baja (103 mJ/cm <sup>2</sup> ) y dosis de UV alta (337 mJ/cm <sup>2</sup> ). “Antes” se obtuvo la muestra previo a la lampara de UV y “Después” se obtuvo posterior a la lampara .....	132
<b>Figura 58.</b>	Efecto en la eficiencia fotosintética en la comunidad fitoplanctónica luego de incrementar las dosis de UV desde 100 hasta 450 mJ/cm <sup>2</sup> . Línea amarilla medición luego de aplicar la dosis y línea verde después de 48 horas.....	133
<b>Figura 59.</b>		134

<b>Figura 60.</b>	Eficiencia fotosintética de <i>A. catenella</i> ( <i>Ac</i> ), <i>K. selliformis</i> ( <i>Ks</i> ) y <i>P. verruculosa</i> ( <i>Pv</i> ) (1000 céls/mL) tratadas con dos tipos de arcillas modificadas a 25 psu y 12 y 18°C .....	137
<b>Figura 61.</b>	Eficiencia fotosintética de <i>A. catenella</i> ( <i>Ac</i> ), <i>K. selliformis</i> ( <i>Ks</i> ) y <i>P. verruculosa</i> ( <i>Pv</i> ) (1000 céls/mL) tratadas con dos tipos de arcillas modificadas a 33 psu y 12 y 18°C .....	138
<b>Figura 62.</b>	Porcentaje de la viabilidad celular de <i>K. selliformis</i> (1000 céls/mL) luego de ser expuestas a diferentes concentraciones de arcillas modificadas por 120 minutos y a diferentes condiciones experimentales de temperatura (12° y 18° C) y salinidad (25 y 33). En rojo la arcilla 1 y en azul la arcilla 2 .....	139
<b>Figura 63.</b>	Porcentaje de la viabilidad celular de <i>P. verruculosa</i> (1000 céls/mL) luego de ser expuestas a diferentes concentraciones de arcillas modificadas por 120 minutos y a diferentes condiciones experimentales de temperatura (12° y 18° C) y salinidad (25 y 33). En rojo la arcilla 1 y en azul la arcilla 2 .....	141
<b>Figura 64.</b>	Porcentaje de la viabilidad celular de <i>A. catenella</i> (1000 céls/mL) luego de ser expuestas a diferentes concentraciones de arcillas modificadas por 120 minutos y a diferentes condiciones experimentales de temperatura (12° y 18° C) y salinidad (25 y 33). En rojo la arcilla 1 y en azul la arcilla 2 .....	142
<b>Figura 65.</b>	Medición de temperatura y pH post-experimentos de <i>A. catenella</i> (1000 céls/mL) durante la exposición a dos tipos de arcillas modificadas a 25 de salinidad y a temperatura 12 °C .....	143
<b>Figura 66.</b>	Medición de temperatura y pH post-experimentos <i>A. catenella</i> (1000 céls/mL) durante la exposición a dos tipos de arcillas modificadas a 33 de salinidad y 12 °C .....	144
<b>Figura 67.</b>	Medición de temperatura y pH post-experimentos <i>A. catenella</i> (1000 céls/mL) durante la exposición a dos tipos de arcillas modificadas a 33 de salinidad y 12 °C .....	145
<b>Figura 68.</b>	Medición de temperatura y pH post-experimentos <i>A. catenella</i> (1000 céls/mL) durante la exposición a dos tipos de arcillas modificadas a 33 de salinidad y 18 °C .....	146
<b>Figura 69.</b>	Medición de temperatura y pH post-experimentos de <i>K. selliformis</i> (1000 céls/mL) expuesta dos tipos de arcillas modificadas a 25 de salinidad y 12 °C .....	147
<b>Figura 70.</b>	Medición de temperatura y pH post-experimentos de <i>K. selliformis</i> (1000 céls/mL) expuesta dos tipos de arcillas modificadas a 33 de salinidad y 12 °C .....	148
<b>Figura 71.</b>	Medición de temperatura y pH post-experimentos de <i>K. selliformis</i> (1.000 céls/mL) expuesta dos tipos de arcillas modificadas a 25 de salinidad y 18 °C .....	149
<b>Figura 72.</b>	Medición de temperatura y pH post-experimentos de <i>K. selliformis</i> (1000 céls/mL) expuesta dos tipos de arcillas modificadas a 33 de salinidad y 18 °C .....	150
<b>Figura 73.</b>	Medición de temperatura y pH post-experimentos de <i>P. verruculosa</i> (1000 céls/mL) expuesta dos tipos de arcillas modificadas a 25 de salinidad y a temperatura 12 °C .....	151
<b>Figura 74.</b>	Medición de temperatura y pH post-experimentos de <i>P. verruculosa</i> (1000 céls/mL) expuesta dos tipos de arcillas modificadas a 25 de salinidad y 18 °C .....	152

<b>Figura 75.</b>	Medición de temperatura y pH post-experimentos de <i>P. verruculosa</i> (1.000 céls/mL) expuesta dos tipos de arcillas modificadas a 33 de salinidad y 12° C	153
<b>Figura 76.</b>	Medición de temperatura y pH post-experimentos de <i>P. verruculosa</i> (1.000 céls/mL) expuesta dos tipos de arcillas modificadas a 33 de salinidad y 18° C	154
<b>Figura 77.</b>	Efecto de la arcilla modificada sobre la viabilidad celular de líneas branquiales (RTgill-W1) luego de ser expuestas por dos horas a 3 tratamientos de arcilla (0,1 , 0,5 y 1 g/L) y a dos tipos de arcilla .....	155
<b>Figura 78.</b>	Efecto de diferentes concentraciones de dos arcillas modificadas (0, 0,1 , 0,5 , 1 g/L) sobre cultivos de 1000 céls/mL de <i>K. selliformis</i> en la viabilidad de células branquiales (RTgill-W1) durante 120 min a 12 y 18 °C de temperatura y a 25 y 33 de salinidad .....	156
<b>Figura 79.</b>	Efecto de diferentes concentraciones de dos arcillas modificadas (0, 0,1 , 0,5 , 1 g/L) en cultivos 1000 céls/mL de <i>A. catenella</i> en la viabilidad de células branquiales (RTgill-W1) durante 120 min a 12 y 18 °C de temperatura y a 25 y 33 de salinidad .....	159
<b>Figura 80.</b>	Efecto de diferentes concentraciones de dos arcillas modificadas (0, 0,1 , 0,5 , 1 g/L) en agua de mar filtrada (0.45 µm) 1000 céls/mL de <i>P. verruculosa</i> en la viabilidad de células branquiales (RTgill-W1) durante 120 min a 12 y 18 °C de temperatura y a 25 y 33 de salinidad .....	158
<b>Figura 81.</b>	Experimento para cuantificar el efecto de las arcillas sobre una comunidad de fitoplacnton que contenía la mitad de las especies toxica. Se evidencio el efecto letal sobre la comunidad para ambas arcillas .....	159
<b>Figura 82.</b>	Alteración del pH por accion de arcilla modificadas sobre la especies en estudio. Se observa como todas las especies se ven a fectadas de la mis forma durante el tiempo de exposición .....	160
<b>Figura 83.</b>	Efecto de dos arcillas modificadas en la viabilidad celular de <i>A. catenella</i> (AC) y <i>K. selliformis</i> (KS) con fitoplancton a una concentración de 0,5 g/L .....	161
<b>Figura 84.</b>	Efecto de las arcillas modificadas sobre microalgas objetivos con fitoplacton en la viabilidad de células branquiales. (RTgill-W1). Expuestas a dos tipos de arcilla a una concentración de 0,5 g/L. A una densidad celular de 1000 céls/mL de <i>A. catenella</i> (AC), <i>K. selliformis</i> (KS) y <i>P. verruculosa</i> (PV) y 1000 céls/mL de fitoplancton. Las mediciones se hicieron por cuadruplicado.....	162
<b>Figura 85.</b>	Efecto en la eficiencia fotosintética (Fv/Fm) del mesocosmo del fiordo Comau expuestas a dos tratamientos con distintas arcillas modificadas (AR1 y AR2). La concentración final de las arcillas fue de 0.5 g/L. Se midió a las 2 horas posteriores de añadido las arcillas. Se realizó el experimento en triplicado....	163
<b>Figura 86.</b>	Efecto en la viabilidad celular del mesocosmo del fiordo Comau expuestas a dos tratamientos con distintas arcillas modificadas (Arcilla 1 y Arcilla 2). La concentración final de las arcillas fue de 0,5 g/L. Se midió a las 2 horas posterior de añadido las arcillas. Se realizó el experimento en triplicado.....	164
<b>Figura 87.</b>	Eficiencia fotosintética de <i>A. catenella</i> , <i>K. selliformis</i> y <i>P. verruculosa</i> , (1000 céls/mL), expuestas a diferentes macroalgas, a 33 psu, a 12°C y un perdió de 24h .....	166
<b>Figura 88.</b>	Viabilidad celular de especies FANs (barras) luego de mantenerlas en cultivo con macroalgas. Símbolos negros muestran la densidad celular de las especies FANs luego de mantenerlas en cultivo con distintas macroalgas. ....	167
<b>Figura 89.</b>	Viabilidad de células branquiales expuestas a muestras de agua tomadas	168

	desde los frascos de cultivo de especies FANs (in) y muestras de agua tomadas desde los estanques (out) .....	
<b>Figura 90.</b>	Variación de pH dentro de los estanques de co-cultivo de macroalgas y <i>K. selliformis</i> (superior) y <i>A. catenella</i> (inferior) .....	169
<b>Figura 91.</b>	Eficiencia fotosintética de la comunidad fitoplanctónica luego de ser mantenida en co-cultivo con 25 gr. macroalga ( <i>Macrocystis pyrifera</i> ). .....	170
<b>Figura 92.</b>	Viabilidad celular de la comunidad fitoplanctónica luego de ser mantenida en co-cultivo con 25 gr. macroalga ( <i>Macrocystis pyrifera</i> ). La comunidad se encuentra dominada por diatomeas (Rojo) y dinofalgelados (azul) .....	171
<b>Figura 93.</b>	Discoloración superficial de la columna de agua en el fiordo Comau debido a la floración de <i>H. akashiwo</i> el 5 de abril de 2021. A) Vista aérea mediante dron y B) vista <i>in situ</i> .....	172
<b>Figura 94.</b>	Perfiles de CTD-O/F en área de mayor concentración celular de <i>H. akashiwo</i> en el fiordo Comau según inspección aérea. A) Temperatura (°C); B) salinidad (psu); C) Fluorescencia (µg/L); D) oxígeno disuelto (mg/L) y abundancia celular de <i>H. akashiwo</i> (células/ mL) .....	173
<b>Figura 95.</b>	A) Floración mono-específica de <i>H. akashiwo</i> en otoño del 2021 en el fiordo Comau; B) formación <i>in situ</i> de agregaciones celulares de <i>H. akashiwo</i> ; C) pellet fecal de copépodo formado con células de <i>H. akashiwo</i> y D) agregaciones celulares de <i>H. akashiwo</i> en frascos de muestreo luego de pocas horas de realizado el muestreo.....	174
<b>Figura 96.</b>	Box plot de los resultados experimentales de la A) abundancia celular de <i>H. akashiwo</i> y B) eficiencia fotosintética de microalgas en 3 estaciones de muestreo, a dos profundidades (0 y 3 m) y en tiempo 0 (sin cortina de burbujas) y tiempo 1 (con cortinas de burbujas) .....	175
<b>Figura 97.</b>	Perfiles oceanográficos obtenidos antes y después de la activación de la cortina de burbujas .....	176
<b>Figura 98.</b>	Perfiles oceanográficos de contornos para observa si existen variaciones proyectadas antes (izquierda) o después (derecha) de la activación de la cortina de burbujas .....	177
<b>Figura 99.</b>	Diversidad de organismo fitoplanctónicos dentro del área de estudio y su distribución en tres estaciones antes (Sin) y después (Con) de la activación del sistema de burbujas. Muestreos realizados a profundidades discretas cada 3m desde superficie hasta 12m .....	178
<b>Figura 100.</b>	Selección de sistemas de mitigación de acuerdo con la efectividad para mitigar microalgas tóxicas y según su impacto en el medio ambiente acuático.	194
<b>ÍNDICE DE FICHAS</b>		
<b>Ficha 1.</b>	Ficha resumen del método de mitigación de arcillas .....	63
<b>Ficha 2.</b>	Ficha resumen de métodos de mitigación en base a aireación .....	65
<b>Ficha 3.</b>	Ficha resumen de mitigación por radiación ultra violeta (UV) .....	72
<b>Ficha 4.</b>	Ficha resumen de mitigación por peróxido de hidrogeno (H2O2) .....	75
<b>Ficha 5.</b>	Ficha resumen de mitigación por dióxido de cloro y cloro .....	77
<b>Ficha 6.</b>	Ficha resumen de mitigación por fotoquímicos y ozono (O <sub>3</sub> ) .....	80
<b>Ficha 7.</b>	Ficha resumen de mitigación por medio de la aproximación IMTA .....	81
<b>Ficha 8.</b>	Ficha resumen de mitigación por otros medios biológicos .....	85

<b>Ficha 9.</b>	Ficha resumen de mitigación utilizando estrategias de evasión .....	92
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b>		
<b>Anexo 1.</b>	Carta Gantt de actividades y resultados esperados .....	224
<b>Anexo 2.</b>	Equipo de trabajo .....	226
<b>Anexo 3.</b>	Tiempo comprometido en otros estudios .....	227
<b>Anexo 4.</b>	Divulgación resultados preliminares (Congreso de ciencias del mar 2021)...	228
<b>Anexo 5.</b>	Informe evaluación in situ de la eficiencia del sistema de cortinas de burbujas en un centro de cultivo de salmones durante la floración de <i>Heterosigma akashiwo</i> en otoño del 2021 .....	229

## 6. ANTECEDENTES

Las Floraciones Algales Nocivas (FANs) y sus toxinas son uno de los principales factores que limitan la producción de proteína animal en ambientes acuáticos en el mundo y especialmente en nuestro país. Chile al ser uno de los líderes mundiales en la producción de mitílidos y salmónidos para exportación, cualquier evento de FANs en las regiones acuícolas de Chile puede crear importantes cambios en la oferta-demanda y en el precio del mercado de estos productos a nivel global. En verano de 2016 en las Regiones de Los Lagos y Aysén, dos eventos de FANs produjeron una de las mayores catástrofes ecológicas y sociales de las que se tengan precedentes en el mundo (Mardones et al., 2020). En una primera floración, la dictiófita *Pseudochattonella verruculosa* produjo en el Seno de Reloncaví una mortalidad de 40.000 toneladas de salmón equivalentes a 800 millones de dólares. Una subsecuente floración, esta vez del dinoflagelado *Alexandrium catenella*, afectó a 200 centros de cultivo de mitílidos y produjo el cierre cautelar por veneno paralizante de mariscos (VPM) por 4 meses. Se estima que las pérdidas económicas para la industria mitílicultora alcanzaron los 2 millones de dólares (~15% en reducción de cosecha comparado con 2015) y dejó sin empleo a más de 1.700 personas (Mardones et al., 2020). Ambos eventos produjeron revueltas sociales por más de 3 semanas en el sur de Chile (Trainer et al., 2019).

Las FANs son eventos naturales altamente complejos, por lo que su prevención, control y/o mitigación requiere de aproximaciones multidisciplinarias. Actualmente, los sistemas de monitoreo de fitoplancton mediante microscopia son la principal herramienta a nivel global para la prevención de los efectos deletéreos de las FANs en las zonas de cultivo. Debido al enorme esfuerzo logístico que el monitoreo implica, nuevas herramientas como la percepción remota y los modelos predictivos están siendo exploradas para predecir la ocurrencia de las FANs. Por otra parte, acciones indirectas de planificación acuícola como, por ejemplo, considerar logísticamente el emplazamiento de los centros de cultivo y minimizar los riesgos de transportes de microalgas tóxicas desde una zona con FANs a una libre de FANs, pueden disminuir de manera considerable los impactos en la producción

acuícola. Cuando estas estrategias de prevención no son suficientes para anticipar y evitar el impacto de un evento FAN, se deben poner en práctica acciones de control y/o mitigación. En la literatura se definen tres categorías de mitigación de las FANs: i) planes espaciales y temporales de las operaciones de acuicultura para evitar o minimizar el riesgo de ocurrencia de una FAN (líneas base), ii) opciones de manejo ambiental holístico para minimizar el riesgo de FANs en las inmediaciones de los centros de cultivo (ej., Acuicultura multitrófica integrada; IMTA de sus siglas en inglés), e iii) intervenciones directas para controlar la presencia o abundancia de especies de microalgas tóxicas (controles físicos, químicos o biológicos). De estas tres categorías, las intervenciones directas mediante controles físicos, químicos y biológicos son las que mayor interés científico han atraído debido a su utilización durante emergencias sanitarias y para el control del transporte de especies plagas. Estos métodos han sido utilizados exitosamente en sistemas cerrados como estanques y aguas lastre de barcos mercantiles (Chorus and Bartram, 1999). Sin embargo, los métodos que funcionan en pequeños estanques o embarcaciones de transporte marítimo son prácticamente inviables en condiciones de floraciones en el océano abierto debido a su limitada efectividad, altos costos y potencial impacto ambiental. De esta manera, los sistemas directos de control de las FANs o de inactivación celular han sido estudiados y evaluados en sistemas cerrados y ii) sistemas abiertos o de ambiente natural.

### **6.1. Sistemas de mitigación de FANs en sistemas cerrados**

Una gran variedad de aditivos químicos ha sido probada para el control y mitigación de las FANs. Los aditivos más comúnmente empleados incluyen alumbre, cloro (hipoclorito de sodio), sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ), cloruro de amonio, permanganato de potasio ( $\text{K}_2\text{MnO}_4$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) con diversos grados de éxito y potenciales problemas ambientales. Los compuestos se añaden generalmente a sistemas cerrados, ya que la dilución reduce rápidamente los niveles de estos biocidas a concentraciones no inhibitorias. Guardiola et al. (2012) ofrece una lista de otros biocidas acuícolas y sus limitaciones. De particular interés son los compuestos químicos extraídos de vegetales

terrestres y bacterias debido a su potencial bajo impacto en el ambiente. Por ejemplo, extractos de Sorgo o Zaína de la familia de las gramíneas puede inhibir el crecimiento de cianobacterias como *Anabaena affinis* y *Microcystis aeruginosa* (Uddin et al., 2012). Extractos de ajo también han sido efectivos en inhibir el crecimiento de dinoflagelados del género *Alexandrium* y *Scrippsiella* (Zhou et al., 2008). Por otra parte, varios péptidos antimicrobianos obtenidos de la bacteria *Helicobacter pylori* son efectivos en destruir células de las rafdoficea *Heterosigma* y *Chattonella* y dinoflagelados de los géneros *Cochlodinium* y *Prorocentrum*, pero sin efecto en diatomeas (Park et al., 2011).

Asimismo, otros tratamientos basados en el deterioro físico de las células han sido probados exitosamente. Por ejemplo, la exposición a la radiación ultravioleta (UV) produce en la mayoría de los microorganismos autótrofos daño en los organelos celulares nucleares. Sin embargo, este tratamiento solo ha sido operado en sistemas cerrados con escasas operaciones en ambientes naturales (Yang et al., 2015). Por otra parte, la cavitación hidráulica que produce microburbujas es capaz de destruir células de microalgas luego de la desintegración de la burbuja. Este tipo de método ha sido utilizado en aguas de lastre con óptimos resultados, pero solo en sistemas muy pequeños (Gregg et al., 2009). El ultrasonido, como una alternativa medioambiental amigable, también ha mostrado buenos resultados en la eliminación de especies de microalgas tóxicas. Wu et al. (2011) han demostrado que el ultrasonido es capaz de controlar cianobacterias en conjunto con sus toxinas disueltas. Alternativamente, la electrólisis has sido evaluada como método físico ya que el paso de la corriente eléctrica produce la generación de radicales libres oxidativos que son letales para organismos planctónicos. Sin embargo, esta técnica ha mostrado una modesta eficiencia/eficacia ya que es bastante selectiva entre las diferentes especies de microalgas (Gregg et al., 2009). Por último, se ha evaluado la mitigación de las FANs usando algún tipo de control biológico, como por ejemplo utilizando el dinoflagelado parásito *Amoebophyra*, virus, bacterias y depredadores planctónicos (Turner, 2006). La mayoría de estos tratamientos han resultado impracticables en ambientes naturales debido a la gran escala de las FANs y porque requieren de gran infraestructura, además de que existe un gran riesgo al introducir estas

especies como estrategia de control ya que podrían afectar la biología de otros organismos en el agua.

En Chile, existen muy pocos estudios que hayan evaluado los métodos de mitigación de microalgas tóxicas y casi su totalidad han sido financiados por las mismas empresas que proveen estos servicios (Seguel et al., 2018a, 2018b). Los escasos estudios efectuados en Chile han probado la exitosa eficacia del peróxido de hidrógeno, dióxido de cloro, radiación ultravioleta y técnicas electroquímicas en la inactivación celular de microalgas tóxicas en condiciones de laboratorio, pero hasta el momento solo han sido probadas en el dinoflagelado productor de toxinas paralizantes *Alexandrium catenella* debido a su pertinencia con el vigente Reglamento de Plagas Hidrobiológicas (REPLA) D.S. (MINECOM) N° 345 de 2005. Estas metodologías de inactivación celular físicas y químicas se logran en ambientes reducidos y controlados, como lo son las aguas transportadas por los wellboats que operan en el sur de Chile para el transporte de salmónidos de cultivo. Por lo tanto, su utilización en el océano abierto, con la finalidad de evitar la contaminación de moluscos bivalvos con toxina paralizante, es totalmente inviable. De esta manera, la utilización de estos métodos en los wellboats solo garantiza una disminución de las probabilidades de dispersión de estas especies de microalgas tóxicas a áreas libres de FANs.

Actualmente, la totalidad de los wellboats poseen un tratamiento de aguas mediante radiación UV (M. Labra - Patagonia Wellboat, Com. Per.) que originalmente fue instaurado para la eliminación del virus ISA según el RESA (Reglamento Sanitario para las especies hidrobiológicas). Si bien esta tecnología muestra una eficacia en la eliminación o inactivación de *Alexandrium catenella* a una intensidad de 170 mJ cm<sup>-2</sup> en condiciones de laboratorio (Seguel et al., 2018a), su eficiencia en otras microalgas tóxicas como *Karenia*, *Heterosigma* o *Pseudochattonella* no ha sido probada. Por otra parte, se desconoce la eficiencia de los tratamientos químicos en la inactivación de especies que producen FAN, además de *A. catenella*, como así también se desconocen los impactos ambientales que pueden producir en el entorno cercano. Como antecedente, no existen estudios en Chile

acerca de la inactivación de quistes de resistencia de *A. catenella* o de otra microalga tóxica.

## **6.2 Sistemas de mitigación de FANs en sistemas abiertos**

En la mayoría de los casos, los sistemas de mitigación de FANs en ambientes abiertos están enfocados a combatir cianobacterias en cuerpos de agua continentales, y en el caso de Chile, para el control de microalgas ictiotóxicas y/o nocivas en la industria del salmón. La mitigación de eventos de FAN en los centros de cultivo de salmónidos no es de prioridad en una región determinada hasta que un fuerte evento tóxico ocurre. Cuando estos eventos suceden por primera vez, se produce cierto caos en las salmoniculturas, plantas de proceso, agencias gubernamentales y servicios de salud. Actualmente, es de amplio conocimiento que los mecanismos microalgales que producen mortalidades de salmones de cultivo difieren ampliamente de los mecanismos tóxicos que afectan a la industria mitílicultora (Mardones et al., 2016). La mortalidad de peces, tanto en cautiverio como salvajes/en el ambiente natural, ha sido en muchas ocasiones asociada con el crecimiento explosivo de microalgas tóxicas y/o nocivas, pero también a especies inocuas. Esto se debe a que biomasas elevadas de microalgas en su fase terminal de crecimiento pueden producir una disminución en la concentración de Oxígeno Disuelto (OD) en la columna de agua, producto de la degradación bacteriana, provocando así la muerte de peces y otros organismos por asfixia. Sin embargo, algunas especies de microalgas pueden generar mortalidad de peces en muy bajas concentraciones celulares, evidenciando un efecto directo nocivo a nivel branquial. Los principales mecanismos atribuidos al daño branquial por parte de este selecto grupo de microalgas son dos: i) daño mecánico de los tejidos debido a la presencia de microestructuras punzantes y/o cortantes, y ii) producción de ictiotoxinas (Mardones et al., 2016).

Para mitigar las FANs que afectan salmónidos en ambientes naturales, varios métodos han sido probados, por ejemplo:

1. Sistemas de aireación desde profundidad para generar surgencia de masas de agua libres de células ictiotóxicas y así diluir la concentración celular en superficie.
2. Cortinas de burbujas para evitar el ingreso horizontal de microalgas tóxicas a los módulos de cultivo, potencialmente mediante la destrucción celular en la barrera de aireación.
3. Faldones perimetrales para evitar el ingreso de microalgas a las balsas jaula.
4. Transportar de peces a jaulas a lugares libres de FANs.
5. Detención del proceso de alimentación de peces para disminuir el metabolismo basal.

Durante la gran floración de la dictiófita *Pseudochattonella verruculosa* en 2016, varios de estos métodos de mitigación fueron utilizados, siendo el (4) y el (5) los únicos que presentaron cierto grado de efectividad, aunque no pudieron evitar la mortalidad masiva de peces. Transportar las jaulas de salmones a lugares libres de microalgas tóxicas conlleva el riesgo de escape de peces, además que complica la logística de alimentación de los peces. Es de particular interés que los sistemas de mitigación más vendidos en Chile, (1) aireación y (2) cortinas de burbujas, no presentaron efectividad contra *P. verruculosa* durante la floración de verano del 2016 (Mardones et al., 2020).

Consecuentemente, es vital explorar nuevas alternativas para la mitigación directa de FANs que puedan afectar a la salmonicultura del sur de Chile. Las nuevas alternativas de mitigación a investigar deben considerar un bajo o casi nulo efecto en el ambiente. Una metodología que ha mostrado alta efectividad en eliminar microalgas ictiotóxicas, y además a sus respectivas toxinas disueltas en el agua, son las arcillas modificadas (Seger et al., 2017). Esta arcilla modificada i) forma una especie de red que atrapa a las microalgas debido a su carga 'positiva' generada de manera artificial y las hace flocular al fondo del océano, inhibe el crecimiento de las microalgas luego de su aplicación e iii) incrementa los niveles de oxígeno en el agua. Sin embargo, su grado de efectividad es especie-específico y es afectada por el pH del sistema acuático en el que se aplican, por lo que su eficacia en los sistemas estuarinos de Chile es uno de los principales temas a investigar. A pesar de que el origen de las arcillas es natural, se desconoce el efecto en la fauna bentónica y

pelágica residente en la zona de aplicación, por lo que este es otro tema prioritario para la investigación. Sin embargo, queda abierta la posibilidad de evaluar el efecto mitigador de arcillas obtenidas en fiordos chilenos con el propósito de evaluar su efectividad contra las FANs sin tratamientos modificadores. Otro método de mitigación con mucho potencial debido a un esperado efecto nulo en el ambiente es la acuicultura multitrófica integrado – IMTA (Chopin et al., 2001). En particular, las macroalgas cultivadas en las inmediaciones de los centros de cultivos de salmónidos y mitílidos tienen el potencial de reciclar los nutrientes (ej., amonio, urea) generados por estos cultivos (pellets no consumidos, fecas y pseudo-fecas) los cuales pueden estimular el crecimiento de las FANs. Paralelamente, las macroalgas producen compuestos alelopáticos que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de un gran número de especies de microalgas tóxicas (Zerrifi et al., 2018). Especies de macroalgas que crecen naturalmente en el sur de Chile como *Macrocystis pyrifera*, *Ulva* sp., y *Agarophyton chilensis*, podrían producir sustancias alelopáticas con el poder de inhibir el crecimiento de ciertas especies que producen.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar diferentes sistemas utilizados a nivel mundial para evitar la dispersión de FAN por causas antrópicas y sistemas para el control de floraciones algales nocivas en el medio natural, evaluando en condiciones controladas, y con cepas tóxicas chilenas la efectividad de los sistemas seleccionados, así como sus posibles impactos mediante técnicas in vitro.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Describir y comparar los sistemas de mitigación o inactivación de células de microalgas tóxicas a nivel mundial para evitar su dispersión y efectos nocivos y/o tóxicos en ambientes naturales con el fin de seleccionar los métodos que pudieran adaptarse a las necesidades nacionales.
2. Realizar experimentos multifactoriales in vitro con al menos tres sistemas de control diferentes, utilizando al menos tres microalgas tóxicas chilenas, para cuantificar el efecto sobre las microalgas y sobre la concentración de toxinas en el agua.
3. Evaluar la peligrosidad de los productos y sub-productos que se generan de la aplicación de los métodos de mitigación o inactivación celular en diferentes condiciones y escalas de tiempo.
4. Identificar brechas normativas y hacer recomendaciones de las condiciones para la utilización y fiscalización de los sistemas de eliminación en sistemas cerrados y del

correcto uso de los sistemas de control en el medio natural, incluyendo una evaluación de volúmenes y costos.



“palabras claves” ó “key words” - del inglés que identifican investigaciones científicas referidas a la materia de estudio. Por otra parte, se considerará información derivada de tesis de grado nacionales e internacionales que puedan contener información novedosa y/o en vías de desarrollo. Para este propósito se realizará una búsqueda en las bases de datos de diferentes universidades a nivel internacional que realicen investigaciones marines asociadas al tema de mitigación de FANs.

## **7.2 Confección de Fichas**

La información recopilada se sistematizará en fichas detalladas explicando el mecanismo de acción, funcionamiento, condiciones de uso, efectividad, especies de microalgas sobre las que se han utilizado, ventajas, desventajas y posibles impactos ambientales de cada uno de los sistemas de mitigación investigados. Todas las referencias bibliográficas utilizadas para la confección de las fichas han sido compiladas dentro de un archivo Excel, anexo1, donde a cada referencia se le ha asignado un número para hacer más fácil y resumida la presentación de la información.

## **7.3 Comparación sistemas de mitigación**

Con la información recopilada se compararán los sistemas de mitigación y/o inactivación celular en términos de efectividad, costos, capacidad de tratamiento e impacto ambiental a corto, mediano y largo plazo. Esto dependerá de la información científica disponible acerca del tema.

## **7.4 Selección de sistemas**

En base a la información recopilada, se realizará una selección de los sistemas que pudieran adaptarse mejor a embarcaciones tipo wellboats y efluentes de estructuras más pequeñas que requieran eliminar microalgas, considerando las características de las aguas presentes en Chile y la relación tiempo volumen de descarga. La selección de los

sistemas se realizará de manera consensuada con la contraparte técnica en una reunión presencial o virtual, en la cual integrantes de este proyecto en propuesta expondrán los resultados obtenidos del análisis comparativo de los sistemas y posibles criterios de selección.

## **7.5 Sistematización de normativa**

Se recopilará y sistematizará la normativa nacional e internacional de un selecto grupo de países que permita y regule el uso de los sistemas de tratamientos seleccionados.

### **Objetivo específico 2**

Realizar experimentos multifactoriales in vitro con al menos tres sistemas de control diferentes, utilizando al menos tres microalgas tóxicas chilenas, para cuantificar el efecto sobre las microalgas y sobre la concentración de toxinas en el agua.

## **7.6 Cultivo y mantención de microalgas**

Las especies *Alexandrium catenella* (CREAN\_AC16), *Karenia selliformis* (CREAN\_KS02) y *Pseudochattonella verruculosa* (CREAN\_PV01), fueron aisladas desde el sistema marino de fiordos y canales del sur de Chile, perteneciendo en la actualidad a la colección de microalgas CREAN-IFOP. Los monocultivos se mantuvieron con agua de mar filtrada estéril (Filtro de membrana Whatman GF/F con un tamaño 45 mm y de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ ), a salinidades de 25 y 33 con temperaturas de 12 y 18 °C. Todos los cultivos fueron enriquecidos con medio L1 (Guillard y Ryther, 1962) con luz fría a una intensidad de 100  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y un fotoperiodo de 16:8 h (luz/oscuridad).

### 7.6.1 Análisis previo de los umbrales de detección de las técnicas propuestas

Preliminarmente, se evaluó el umbral de detección de la eficiencia fotosintética. Para esto se utilizó un flúorometro que se basa en el método **FRRF** - Rápida Tasa de Repetición Fluorométrica en el tiempo (siglas en inglés **Fast Repetition Rate Fluorometry**) modelo Fast-Ocean de Chelsea Technologies, UK, que permite realizar estimaciones instantáneas de la productividad primaria bruta.

Para estimar el umbral de detección del método FRRF, se realizaron diluciones desde la densidad celular más alta (1000 céls/mL) a la más baja (10 céls/mL) en un volumen final de 40 mL, para cada especie. Para la evaluación del método, se extrajeron 5 ml desde los frascos de cultivos. El contenido fue dispuesto en un tubo de ensayo transparente dispuesto en el interior de un flúorometro y se realizaron 30 mediciones por densidad celular.

### 7.6.2 Medición de fotosíntesis mediante fluorescencia de altas tasas de repetición (FRRF)

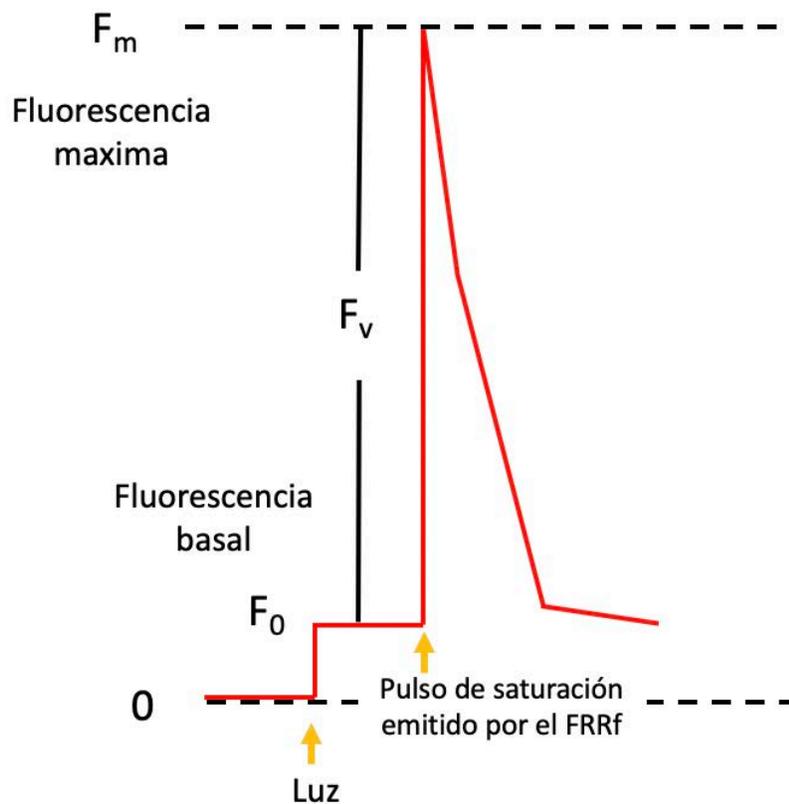
Esta estimación de la eficiencia fotosintética se realiza con el cálculo de  $F_v/F_m$  (1), este corresponde al valor ajustado tras la extrapolación de la curva frente a un flujo de fotones, lo cual refleja la operatividad máxima adaptativa a la oscuridad del fotosistema II y el parámetro de saturación de la luz en una muestra de fitoplancton. Por lo cual, para el cálculo de esto se asume que no solo a la biomasa, sino también, el estado fisiológico de las microalgas dentro de los cultivos (o en la columna de agua) deberían mostrar una distribución homogénea (sin influencia de algún químico). La eficiencia fotosintética se describe a continuación:

$$\text{Eficiencia fotosintética} = (F_m - F_o) / (F_m') = F_v/F_m$$

Donde  $F_o$  es la Fluorescencia basal,  $F_m$  la Fluorescencia máxima,  $F_v$  la Fluorescencia

variable ( $F_m - F_0$ ) y el  $F_v/F_m$  corresponde a la división de la fluorescencia variable por la fluorescencia máxima (**Figura 1**).

Los valores para la eficiencia fotosintética representan una razón con rangos entre 0 a 1, considerando como óptimo los valores cercanos a 0,5, los cuales evidencian un buen rendimiento fotosintético de las microalgas. Conjuntamente, se midió la eficiencia fotosintética en agua de mar filtrada y estéril a 25 y 33 de salinidad (blancos) para estimar el error estándar de lectura del fluorómetro para los experimentos.

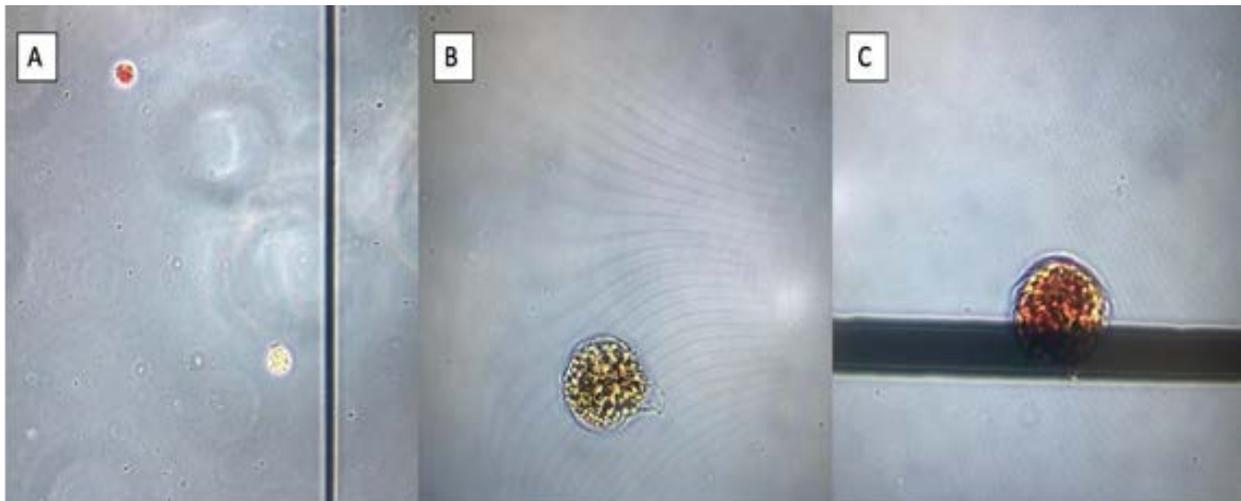


**Figura 1:** Representación esquemática de los parámetros de fluorescencia medidos. Adaptación de Salazar et al. 2016.

### 7.6.3 Evaluación de la viabilidad celular con rojo neutro

Se utilizó la tinción rojo neutro para evaluar la viabilidad celular de las microalgas en cada técnica mitigación. Esta tinción es un colorante catiónico soluble en agua capaz de atravesar la membrana plasmática de las células intactas y se concentra en los lisosomas de las células viables. Se utilizó el protocolo de Onji et al., 2000 con modificaciones.

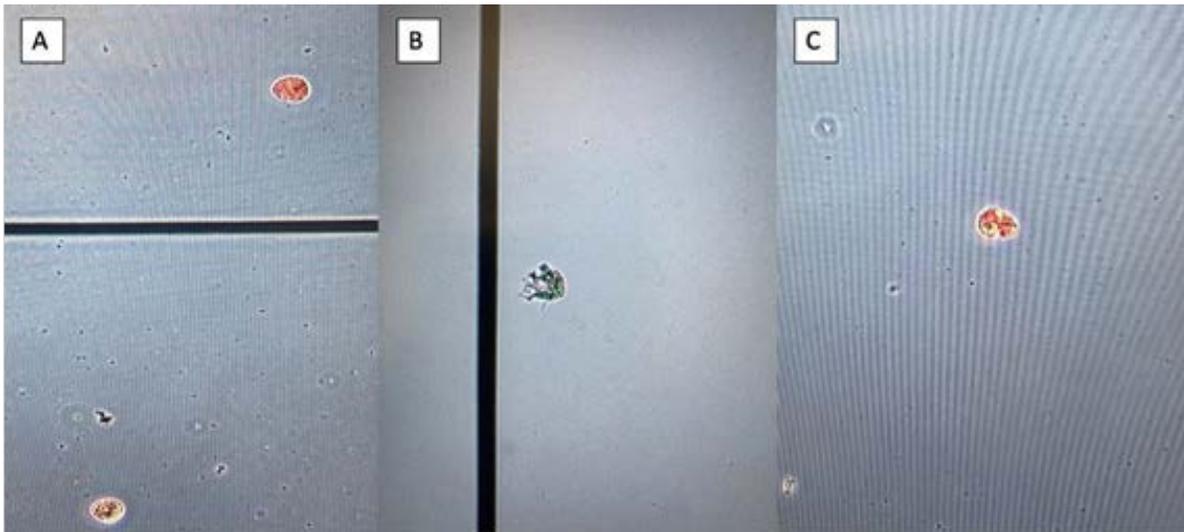
Se disolvió 0,5 g del reactivo rojo neutro (Sigma-Aldrich) en un tubo falcón de 50 mL con etanol al 95% (concentración final del stock fue del 1% m/v), se filtró 0,22 mm y se guardó a 4 °C. Previo a su uso, se diluyó el stock en un tubo Eppendorf de 2 mL con agua de mar filtrada estéril (0,22 mm) y aclimatada a temperatura ambiente, en una relación 1:5 (concentración final de 0,2% m/v). A los 60 min del experimento, se obtuvo un inóculo de 1,8 mL de cada tratamiento de las especies *A. catenella* (Ac), y *K. selliformis* (Ks) a estas se añadió 0,2 mL de rojo neutro (dilución 10:1 respectivamente) y se incubó en temperatura ambiente durante 20 min.



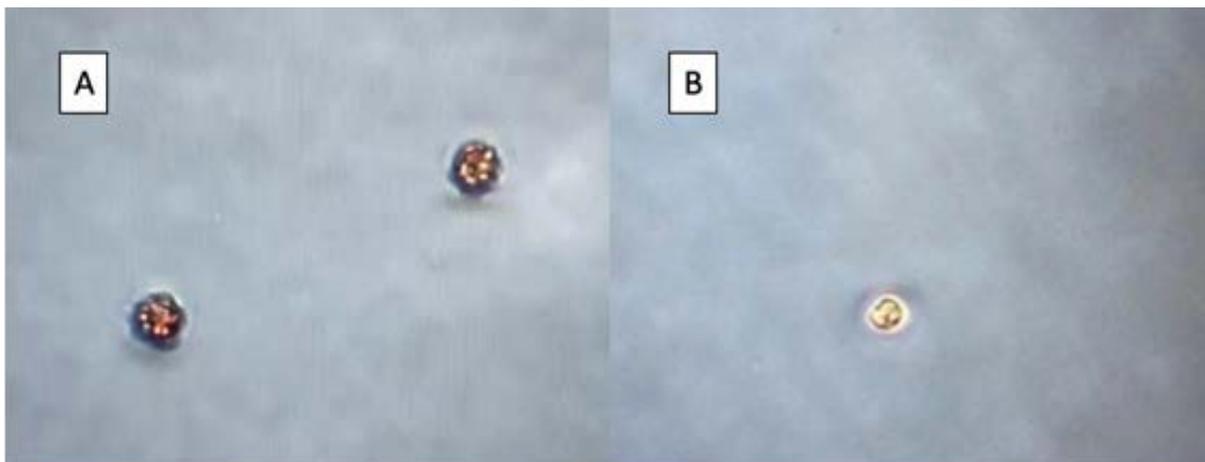
**Figura 2.** Imágenes de microscopía de luz de la tinción rojo neutro en *A. catenella* (Ac). (A) células de *A. catenella* (Ac) con tinción en rojo (viva) y sin tinción (muertas) a 20x. (B) Célula sin tinción (muerta) 40x. (C) Célula con tinción (viva) 40x.

Para la especie *P. verruculosa*, se obtuvo un inóculo de 1,9 mL de cada tratamiento, se le añadió 0,067 mL de rojo neutro (dilución 30:1) y se incubó a temperatura ambiente durante

15 min. Se homogenizó el cultivo teñido y se agregó 1 mL a una cámara Sedgwick Rafter para los experimentos realizados con las especies *Alexandrium catenella* y *Karenia selliformis*. Posteriormente, se contabilizaron las células teñidas (visualización de la tinción, **Figura 2** y **Figura 3**) y 0,02 mL a una cámara Fuch-Rosenthal para la especie *P. verruculosa* (visualización de la tinción, **Figura 4**). El recuento de células en la cámara Fuch-Rosenthal es mínimo de 312,5 céls/mL, por lo que, solo se realizaron experimentos en esas densidades celulares para la especie *P. verruculosa*.



**Figura 3.** Imágenes de microscopía de luz de la tinción rojo neutro en *K. selliformis* (Ks). (A) células de *K. selliformis* teñida (viva) y sin tinción (muertas) a 20x. (B) Célula sin tinción (muerta) 40x. (C) Célula con tinción roja (viva) 40x.

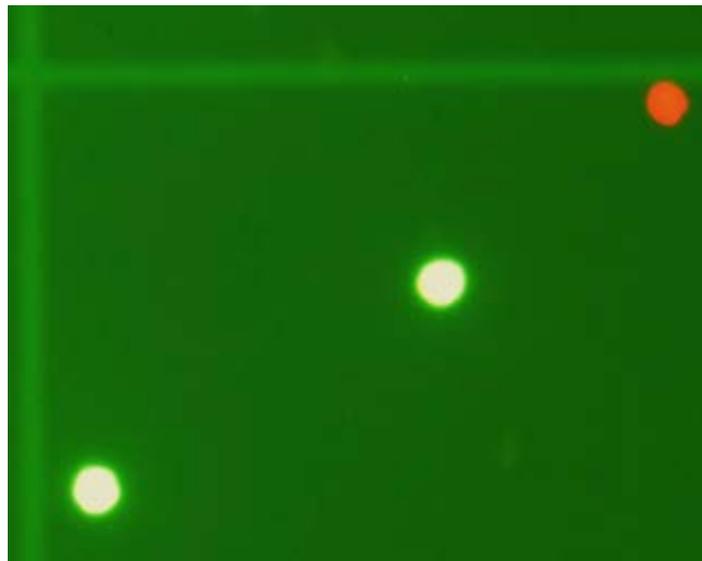


**Figura 4.** Imágenes de microscopía de luz de la tinción rojo neutro en *P. verruculosa* (PV), (A) células de *P. verruculosa* teñida (viva) en 40x (B) Célula sin tinción (muerta) en 40x.

#### 7.6.4 Evaluación de la viabilidad celular con FDA

Se utilizó la tinción diacetato de fluoresceína (FDA, Invitrogen™) para evaluar la viabilidad celular de la microalga *Alexandrium catenella* en mitigación de sistemas abiertos (arcillas modificadas y macroalgas). Mediante la hidrólisis, el FDA se observa de color verde fluorescente cuando las células están vivas, y de color rojo cuando las células tienen daño a nivel de membrana (señal de muerte celular). Para estas mediciones se utilizó el protocolo de Onji et al., 2000 con modificaciones.

El FDA fue disuelto en Dimetilsulfóxido (DMSO) en una concentración final de 5 mg/mL y guardado a 4°C. A cada muestra se le añadió 1 uL/mL de tinción y se incubó por 10 min a temperatura ambiente y con luz. Se homogenizó el cultivo teñido y se agregó 1 mL a una cámara Sedgwick-Rafter para cuantificación de la especie *Alexandrium catenella* en un microscopio de epifluorescencia (Filtros de excitación 450-490 nm y emisión 515 nm) (Figura 5).



**Figura 5:** Imagen de microscopia de epifluorescencia de la tinción FDA en *A. catenella* (Ac). (A) células de *A. catenella* verde fluorescente (viva) en 10x (B) Célula color rojo (muerta) en 10x.

## 7.7 Cultivo y mantención de líneas celulares branquiales RTgill-W1

La línea celular RTgill-W1, proviene de una aislación de filamentos branquiales de trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Bols et al., 1994), la cual fue adquirida de la American Type Culture Collection (CRL- 2523, ATCC). Estas células se cultivaron a 19 °C en oscuridad con medio L-15 de Leibovitz (L1518 Sigma), suplementado con suero fetal bovino al 10% (v / v) (FBS, 12003C, Sigma) y con una solución antibiótico- antimicótica (A5955, Sigma; con estreptomycin (10 mg/mL), anfotericina B (25 mg/mL) y penicilina (10,000 unidades/mL). Los cultivos se mantienen en frascos EasYFlask de 40 mL (Thermo Scientific™ Nunc™) tratados para cultivos celular y se cambia el medio L-15 de Leibovitz dos veces por semana (**Figura 6**).

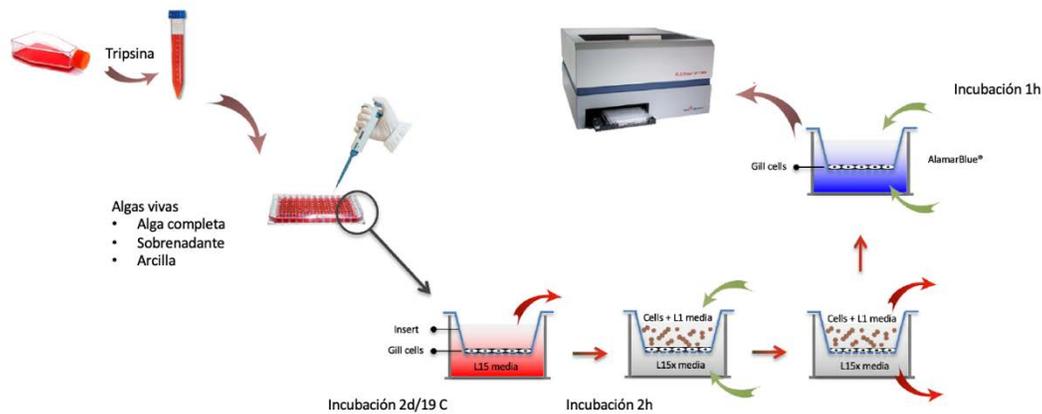


**Figura 6:** Crecimiento de las líneas celulares RTgill-W1 (*Oncorhynchus mykiss*). (A) Crecimiento de las líneas celulares al día 2 de ser repicadas; (B) Crecimiento de las líneas celulares al día 4; (C) Crecimiento de las líneas celulares al día 10.

## 7.8 Experimento con líneas celulares de RT gill-W1

Los cultivos de células branquiales confluentes (80-90%) se tripsinizaron para su desprendimiento del frasco, se contaron con una cámara de Fuch-Rosenthal y se ajustó con medio L-15 a una concentración de  $1-2 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Posteriormente, las células branquiales se siembran por cuadruplicado en microplacas de 96 pocillos utilizando un volumen de 100  $\mu\text{L}$  por pocillo. Las placas sembradas se incubaron durante 2 días a 19 °C en la oscuridad. Se descartó el medio L-15, se lavó las células con PBS y se exponen a 100  $\mu\text{L}$  de los tratamientos experimentales durante 2h a 19 °C. Finalmente se descartó el

contenido y se añade 100 µL de la tinción de alamarBlue al 5 % (DAL1025, Invitrogen) durante 1 hora. Se midió la viabilidad celular usando un lector de microplacas (FLUOstar Omega, BMG Labtech 415-2871), el cual detecta la fluorescencia de la tinción con filtros de excitación y emisión de 540 y 590 nm, respectivamente. La viabilidad de las células branquiales se expresó en porcentaje de respuesta de los tratamientos en relación con el control solo con agua de mar (% de control) (**Figura 7**).



**Figura 7:** Bio-ensayo con líneas branquiales RTgill-W1 (*Oncorhynchus mykiss*) para determinar sustancias tóxicas en el medio disuelto liberado por microalgas tóxicas, además para determinar la toxicidad de los métodos de mitigación utilizados (ilustrado de Mardones et al., 2015).

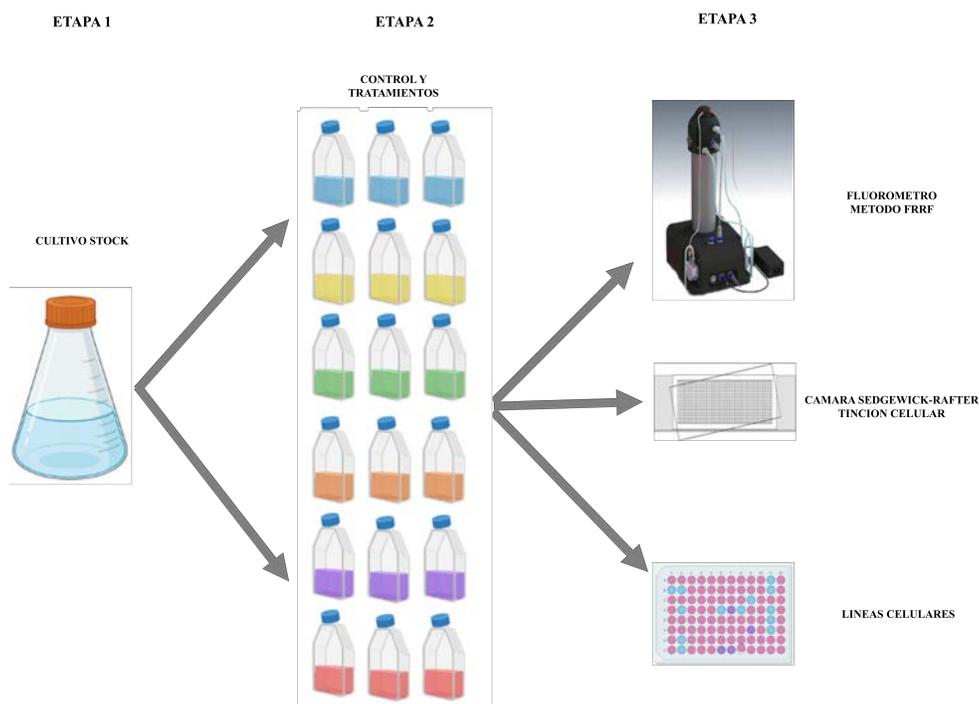
## 7.9 Sistemas de mitigación cerrados

### 7.9.1 Peróxido de hidrógeno

#### 1) Experimentos con monocultivos

La fase experimental tiene como propósito determinar la eficiencia del peróxido de hidrógeno a 30% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Sigma Adrich - Merck, Chile) a distintas concentraciones y su efecto como alguicida sobre las tres microalgas solicitadas en la propuesta.

El diseño experimental consistió en inocular 6 concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0, 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm) a dos densidades celulares (100 y 1000 céls/mL) para las especies *A. catenella* (Ac) y *K. selliformis* (Ks) y en una densidad celular de 1000 céls/mL en *P. verruculosa* (Pv). En un volumen final de experimentación para todas las especies de microalga fue de 40 mL con agua de mar filtrada, esterilizada y en triplicado. Se evaluó la fotosíntesis durante periodos de 0, 30 y 60 min (Etapa 2). Al terminar el periodo de experimentación (60 min), se cuantificó la viabilidad celular de las microalgas mediante tinción de metabolismo celular (Rojo Neutro) y la citotoxicidad mediante la viabilidad de líneas celulares branquiales RTgill-W1 (Etapa 3; **Figura 8**).



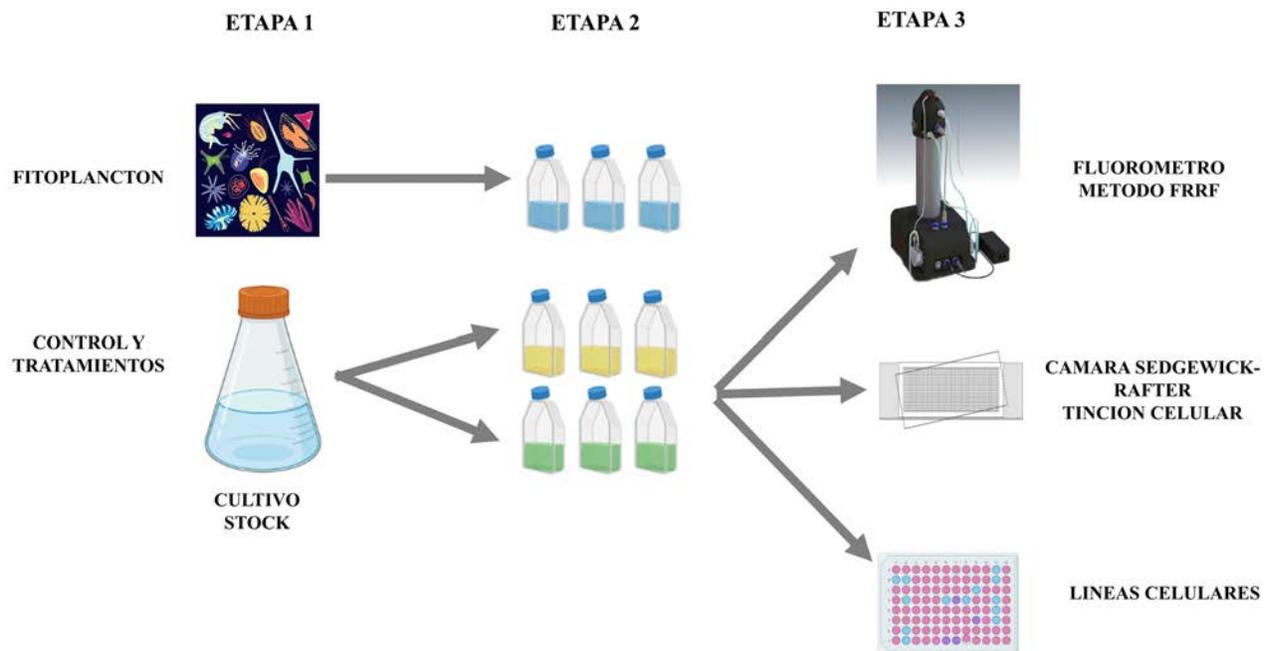
**Figura 8:** Esquema de trabajo experimental con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y microalgas toxicas fitoplanctónica. Etapa 1, cultivos monoclonales. Etapa 2, desarrollo experimental con 6 concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0, 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm) a dos densidades celulares (100 y 1000 céls/mL). Color azul representa el control, color amarillo 100 ppm y color verde 500 ppm de peróxido de hidrógeno). Etapa 3, validación de los datos obtenido con diversas técnicas analíticas.

## 2) Experimentos de monocultivos con fitoplancton

La fase experimental tuvo como propósito evaluar la efectividad del método de mitigación con peróxido de hidrogeno a 30% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Sigma Adrich), mediante su evaluación a varias concentraciones experimentales mezclando una comunidad fitoplanctónica con las microalgas tóxicas objetivo de este estudio.

Los experimentos realizados contemplaron la utilización de fitoplancton extraído en las cercanías del Seno de Reloncaví (Región de Los Lagos). La comunidad fitoplanctónica fue dominada principalmente por los géneros *Chaetoceros*, *Eucampia*, *Guinardia*, *Paralia*, *Protoperdinum*, *Rhizosolenia* y *Tripes*. Esta comunidad se mantuvo en cultivo con medio L1 enriquecido con Si (sílice, especialmente para diatomeas) (Guillard y Ryther, 1962), a una salinidad de 33 y a una temperatura de 18 °C. Además, se aclimató la comunidad a una de fluorescencia de 100  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con un fotoperiodo de 16:8 h (luz/oscuridad), por 2 días.

En la etapa de experimentación, a cada uno de los tratamientos se le incorporó una abundancia similar de fitoplancton para realizar una mezcla en proporciones de 1:1. Donde la densidad celular tanto para el monocultivo como para el fitoplancton fue de 1000 céls/mL. El diseño experimental consistió en inocular 3 concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0, 100 y 500 ppm). En un volumen final de experimentación para todas las especies de microalga fue de 40 mL con agua de mar filtrada, esterilizada y en triplicado. Se evaluó la fotosíntesis durante periodos de 0, 30 y 60 min (Etapa 2). Al terminar el periodo de experimentación (60 min), se cuantificó la viabilidad celular de las microalgas mediante tinción de metabolismo celular (Rojo neutro) y la citotoxicidad mediante la viabilidad de líneas celulares branquiales RTgill-W1. (**Figura 9**)



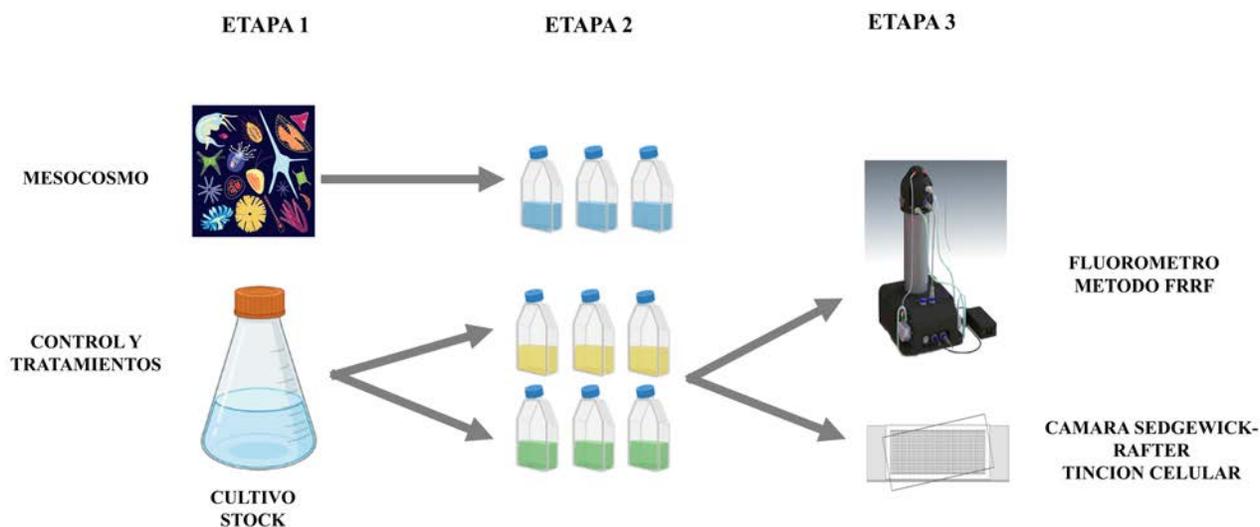
**Figura 9:** Esquema de trabajo experimental con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y comunidad fitoplanctónica. Etapa 1, cultivos monoclonales y aclimatación del fitoplancton. Etapa 2, desarrollo de cultivos heterogéneos con abundancias en razones 1:1 (Color azul representa el control, color amarillo 100 ppm y color verde 500 ppm de peróxido de hidrógeno). Etapa 3, validación de los datos obtenido con diversas técnicas analíticas.

### 3) Experimentos en terreno con mesocosmos

La fase experimental tuvo como propósito evaluar la efectividad del método de mitigación con peróxido de hidrógeno a 30% ( $H_2O_2$ ) en un mesocosmos natural, extraídos con una red de fitoplancton de 23  $\mu m$  en el fiordo Comau. Se evaluaron a varias concentraciones experimentales en una comunidad planctónica.

Los experimentos realizados se realizaron con mesocosmos extraído en el fiordo Comau (Región de Los Lagos). El experimento se realizó a las mismas condiciones de salinidad y temperatura que se encontraron los organismos (23 de salinidad y 15 °C). Además, se realizó el experimento a una de fluorescencia de 100  $\mu mol$  fotón  $m^{-2}s^{-1}$ .

En la etapa de experimentación, a cada uno de los tratamientos se le incorporó una abundancia de 2000 céls/mL de fitoplancton. El diseño experimental consistió en inocular 3 concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0, 10 y 25 ppm). El volumen final de experimentación para todos los tratamientos fue de 200 mL con agua de mar filtrada y en triplicado. Se evaluó la fotosíntesis durante periodos de 1 y 3h. Al terminar el periodo de experimentación (120 min), se cuantificó la viabilidad celular de las microalgas mediante tinción de metabolismo celular, rojo neutro (**Figura 10**).



**Figura 10:** Esquema de trabajo experimental con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y mesocosmos del fiordo Comau. Etapa 1, obtención de mesocosmos. Etapa 2, Color azul representa el control, color amarillo 10 ppm y color verde 25 ppm de peróxido de hidrógeno). Etapa 3, validación de los datos obtenido con diversas técnicas analíticas.

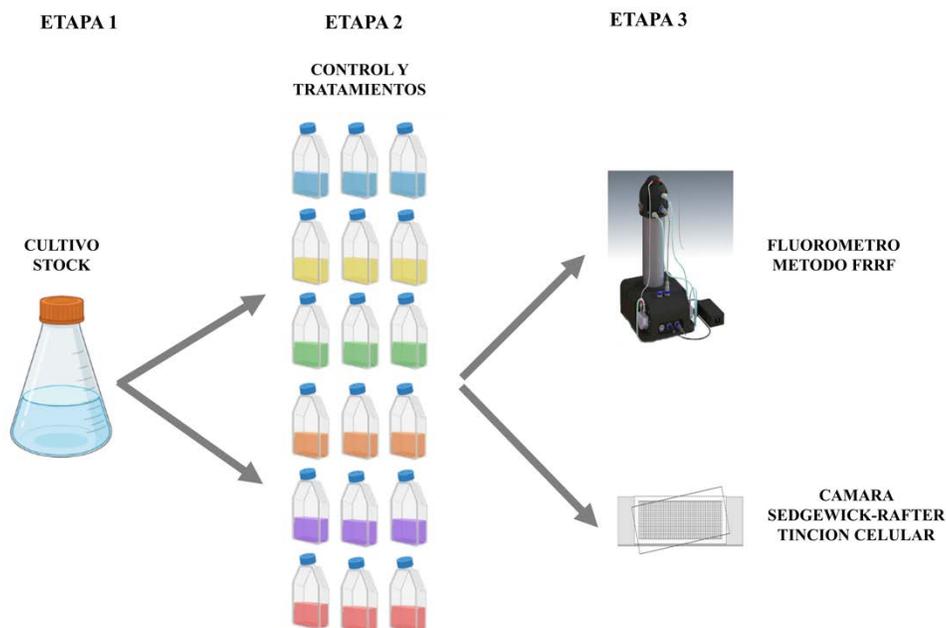
### 7.9.2 Dióxido de cloro

#### 1) Experimentos de monocultivos

La fase experimental tiene como propósito determinar la eficiencia del Dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>) (Winkler, Chile) a distintas concentraciones y su efecto como alguicida sobre las tres microalgas solicitadas en la propuesta.

El diseño experimental consistió en inocular 6 concentraciones de ClO<sub>2</sub> (0, 1, 10, 20, 50 y

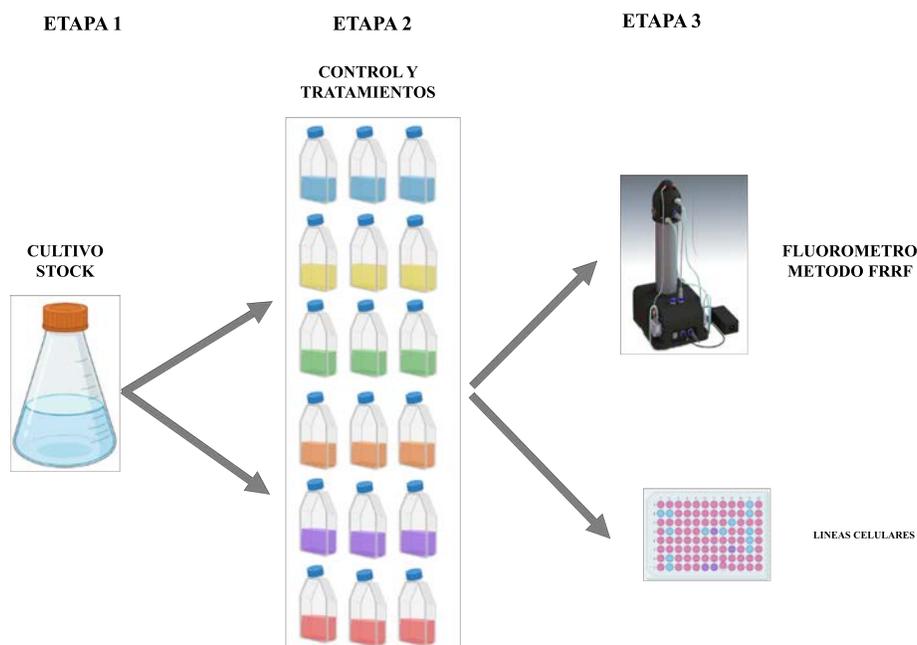
100 ppm) en una densidad celular (100 céls/mL) para la especie *K. selliformis* (Ks). Los experimentos se realizaron con un volumen final de 40 mL con agua de mar filtrada, esterilizada y en triplicado. Se evaluó la fotosíntesis durante periodos de 0, 30 y 60 min (**Figura 11**).



**Figura 11.** Esquema de trabajo experimental para dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ). Etapa 1: concentraciones celulares de cultivos monoclonales (céls/mL). Etapa 2: Tratamientos utilizados - Color azul representa el control y amarillo a rojo, concentraciones experimentales utilizados (1 a 1000 ppm). Etapa 3: validación de los datos obtenido con diversas técnicas.

## 2) Determinación de la dosis de experimentación

El diseño experimental consistió en inocular a seis concentraciones (0, 1, 10, 100, 1000 y 10000 ppm) en una densidad celular de 1000 céls/mL para las especies *A. catenella*, *K. selliformis* y *P. verruculosa* (Etapa 1). Los experimentos se realizaron con un volumen final de 40 mL con agua de mar filtrada, esterilizada y en triplicado. Se evaluó la fotosíntesis durante periodos de 0, 30 y 60 min (Etapa 2) (**Figura 12**)



**Figura 12.** Esquema de trabajo experimental para dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ). Etapa 1: concentraciones celulares de cultivos monoclonales (células/mL). Etapa 2: Tratamientos utilizados - Color azul representa el control y amarillo a rojo, concentraciones experimentales utilizados (1 a 1000 ppm). Etapa 3: validación de los datos obtenidos con diversas técnicas FRRf y líneas celulares.

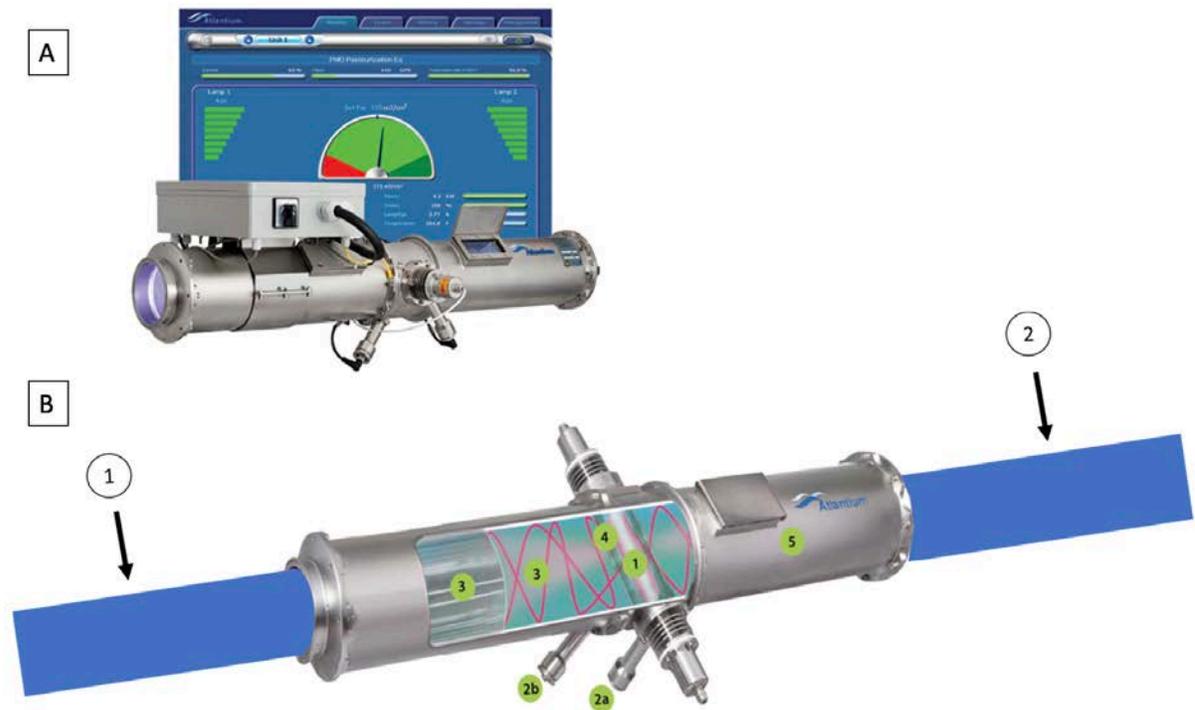
### 7.9.3 Radiación ultravioleta (UV)

La fase experimental tuvo como propósito determinar la efectividad de la radiación ultravioleta (UV) como agente de mitigación de floraciones algales nocivas. Para ello, se sostuvieron reuniones con la empresa Atlantium's Hydro-Optic, encargada de proporcionar e instalar este sistema en wellboat y piscicultura en la región de los Lagos. Se realizaron una serie de visitas técnicas a las instalaciones, donde el proveedor entregó indicaciones para poder utilizar el equipo con el rendimiento mínimo y máximo de operatividad. Al mismo tiempo, se realizó una reunión con empresa Patagonia Wellboat, y se gestionó un experimento *in situ* a bordo de un wellboat.

Durante marzo del año en curso, se utilizó el sistema de radiación ultravioleta (UV) Hydro-Optic, a bordo del wellboat Patagonia 6 (**Figura 13A**). El grupo de trabajo participó durante este periodo, en el proceso de instalación, calibración y operación de las lámparas UV,

situadas en el sistema de purificación de los almacenes de transporte de la embarcación. Durante 72 h se probaron los efectos del UV sobre los organismos fitoplanctónicos presentes en el sistema marino entre Dalcahue y el fiordo Comau, periodo y área en el cual una floración del dinoflagelado inócuo *Prorocentrum micans*.

Se realizaron tres experimentos: (1) Evaluación de la dosis normal que se utiliza en los well boats (Dosis de  $100 \pm 10$  mJ/cm<sup>2</sup>), midiendo a los 0, 30 y 60 minutos posterior a la exposición con UV; (2) Comparación del efecto de una dosis baja (103 mJ/cm<sup>2</sup>) y una dosis alta (337 mJ/cm<sup>2</sup>) de UV, midiendo a los 0 y 60 minutos posterior a la exposición. En estos dos experimentos se evaluó la eficiencia fotosintética y viabilidad celular del fitoplancton. Y un tercer experimento (3) evaluando el aumento gradual de la dosis de UV hasta el máximo permitido por el equipo. Estas intensidades de UV fueron entre 100 y 450 mJ/cm<sup>2</sup> (Subiendo en rangos de 50 mJ/cm<sup>2</sup>). Los efectos de estas intensidades de UV sobre el fitoplancton se midió a los 0, 24 y 48 horas posterior a la exposición. Los tres experimentos fueron medidos antes y después de haber estado en contacto con la lámpara UV (**Figura 13B**).



**Figura 13:** (A) Sistema de radiación ultravioleta (UV) Atlantium's Hydro-Optic. (B) Modelo experimental de lugares donde se obtuvieron las muestras. 1) Sin UV, obtención previo al contacto con la lampara UV. 2) Con UV, obtención posterior al contacto con la lampara UV.

## 8.1 Sistemas de mitigación abiertos

### 8.1.1 Arcillas modificadas

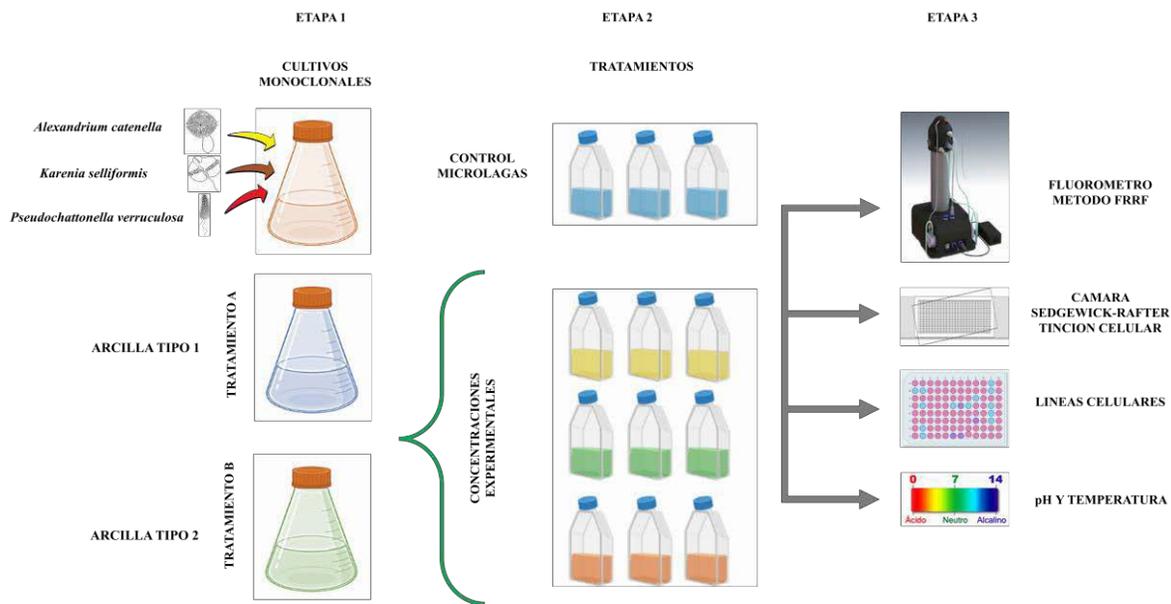
#### 1) Experimentos de monocultivos

La fase experimental tuvo como propósito determinar la eficiencia de las arcillas modificadas a distintas concentraciones y su efecto como alguicida sobre los tres cultivos monoclonales, solicitados en la propuesta.

El diseño experimental consistió en inocular frascos, con una densidad celular para las tres

especies (1000 céls/mL). A cada uno de los frascos con microalgas se le agregaron 3 distintas concentraciones de arcillas modificadas (0,1 – 0,5 y 1 g/L) (Etapa 1, **Figura 14**). Los experimentos se realizaron para cada especie con agua de mar filtrada y esterilizada hasta complementar un volumen final de 40 mL y por triplicado. Se evaluó la eficiencia fotosintética durante un periodo de 120 min (Etapa 2, **Figura 14**). Este procedimiento se realizó para los dos tipos de arcilla modifica (tipo 1 y tipo 2).

Al terminar el periodo de experimentación (120 min), se midió la eficiencia fotosintética y el pH a cada tratamiento con las distintas arcillas modificadas (tipo 1 y tipo 2) y se cuantificó la viabilidad celular mediante tinción de metabolismo celular (Rojo Neutro) para las especies *P. verruculosa* y *K. selliformis* y la tinción FDA para la especie *A. catenella*. Además, se determinó la existencia de subproductos tóxicos realizando un ensayo de citotoxicidad utilizando la línea celular branquial RTgill-W1 (Etapa 3, **Figura 14**).



**Figura 14:** Esquema de trabajo experimental para arcillas modificadas (Tipo 1 y Tipo 2). Etapa 1: concentraciones celulares cultivos monoclonales (céls/mL) y preparación de solución de arcillas en recipientes. Etapa 2: Tratamientos utilizados - Color azul representa el control de microalgas y amarillo, verde y naranja representan las concentraciones experimentales utilizadas (0,1 – 0,5 y 1 g/L) para cada uno de los tipos de arcillas. Etapa 3: validación de los datos obtenido con diversas

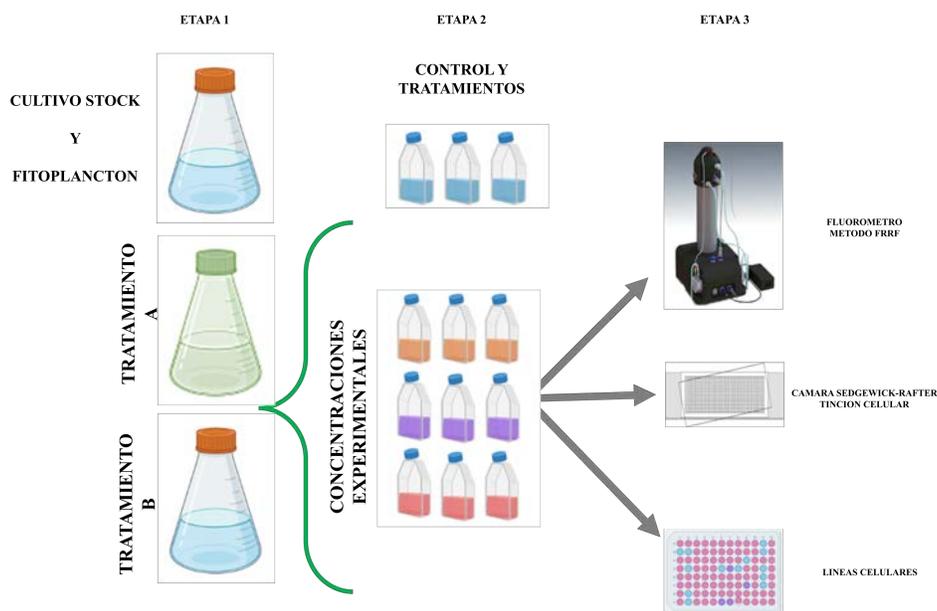
técnicas de análisis.

## 2) Experimentos de monocultivos con fitoplancton

La fase experimental tuvo como propósito determinar la eficiencia de las arcillas modificadas a distintas concentraciones, mediante su evaluación a varias concentraciones experimentales mezclando una comunidad fitoplanctónica con las microalgas tóxicas objetivo de este estudio.

Los experimentos realizados contemplaron la utilización de fitoplancton extraído en las cercanías del Seno de Reloncaví (Región de Los Lagos). La comunidad fitoplanctónica fue dominada principalmente por los géneros *Chaetoceros*, *Eucampia*, *Guinardia*, *Paralia*, *Protoperdinum*, *Rhizosolenia* y *Tripos*. Esta comunidad se mantuvo en cultivo con medio L1 enriquecido con Si (sílice, especialmente para diatomeas) (Guillard y Ryther, 1962), a una salinidad de 33 y a una temperatura de 18 °C. Además, se aclimató la comunidad a una intensidad lumínica de 100  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con un fotoperiodo de 16:8 h (luz/oscuridad), por 2 días.

El diseño experimental se realizó como se explica a continuación : las tres especies objetivo y la comunidad fitoplanctónica se ajustaron a una densidad celular de 1000 céls/mL y fueron expuestas a 2 arcillas modificadas diferentes (tipo 1 y tipo 2) a una concentración de arcilla de 0,5 g/L. Los experimentos se realizaron para cada especie con agua de mar filtrada y esterilizada hasta complementar un volumen final de 40 mL y por triplicado. Al finalizar el periodo de 120 min, se evaluó la eficiencia fotosintética y el pH, y se cuantificó la viabilidad celular mediante tinción de metabolismo celular (Rojo Neutro) para las especies *P. verruculosa* (Pv) y *K. selliformis* (Ks) y la tinción FDA para la especie *A. catenella* (Ac). Además, se determinó la existencia de subproductos tóxicos realizando un ensayo de citotoxicidad utilizando la línea celular branquial RTgill-W1 (**Figura 15**).

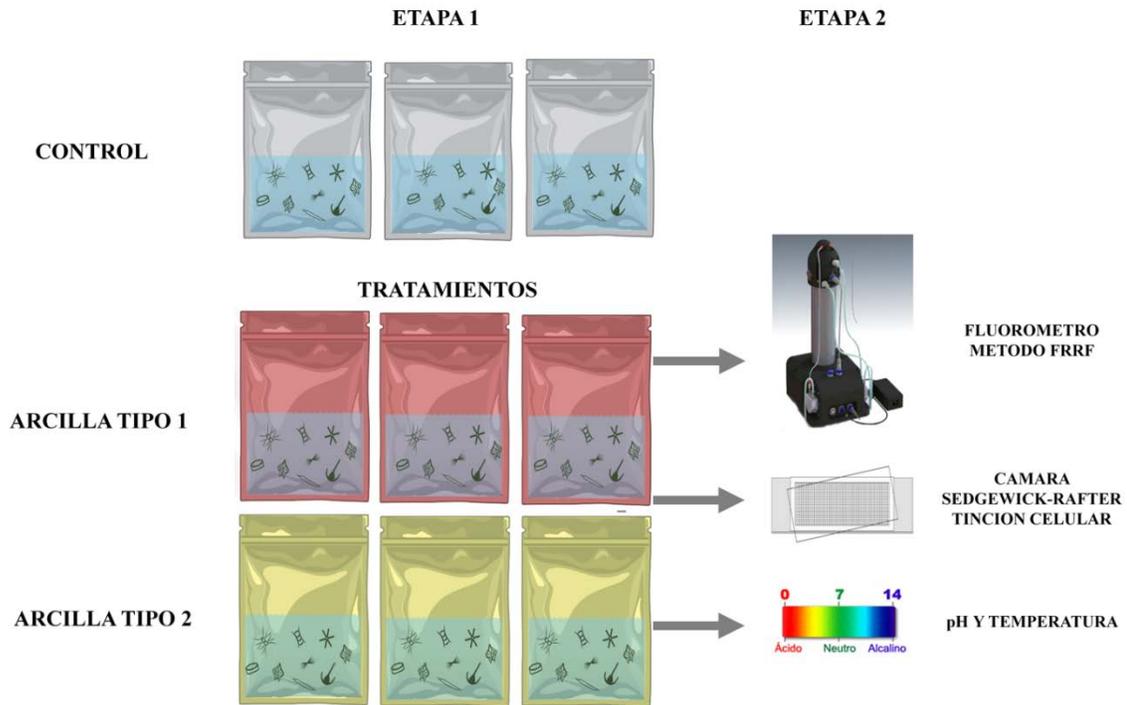


**Figura 15:** Esquema de trabajo experimental para arcillas modificadas (Tipo 1 y Tipo 2) y comunidad fitoplanctónica. Etapa 1, cultivos monoclonales, aclimatación del fitoplancton y preparación de solución de arcillas en recipientes. Etapa 2: Tratamientos utilizados - Color azul representa el control de microalgas y naranja, morado y rojo representan las concentraciones experimentales utilizadas (0,1 , 0,5 y 1 g/L) para cada uno de los tipos de arcillas. Etapa 3: validación de los datos obtenido con diversas técnicas de análisis.

### 3) Experimentos en terreno con mesocosmos

La fase experimental tuvo como propósito determinar la eficiencia de las arcillas modificadas en un mesocosmos natural, extraídos con una red de fitoplancton de 23  $\mu\text{m}$  en el fiordo Comau. El experimento se realizó con mesocosmos extraído en el fiordo Comau (Región de Los Lagos). Se replicaron las mismas condiciones de salinidad que se encontraron los organismos (25 de salinidad). Este experimento se realizó en un sistema cerrado, en condiciones de movimiento de mareas y de temperatura del fiordo (**Figura 16**) El diseño experimental consistió que a una densidad celular de fitoplancton de 2000 céls/mL se le añadieron 2 arcillas diferentes (tipo 1 y tipo 2) a una de 0,5 g/L. Los experimentos se realizaron con agua de mar filtrada y esterilizada hasta complementar un volumen final de 6 L y por triplicado. Al finalizar el periodo de 120 min, se evaluó la eficiencia fotosintética, y se cuantificó la viabilidad celular mediante tinción de metabolismo

celular (Rojo Neutro) para el fitoplancton. La comunidad fitoplanctónica se dividió en dos grandes grupos (dinoflagelados y diatomeas) como microalgas centinelas y que pueden generar floraciones algales nocivas en el sistema (ej., *Pseudo-nitzschia sp.*) (**Figura 16**).



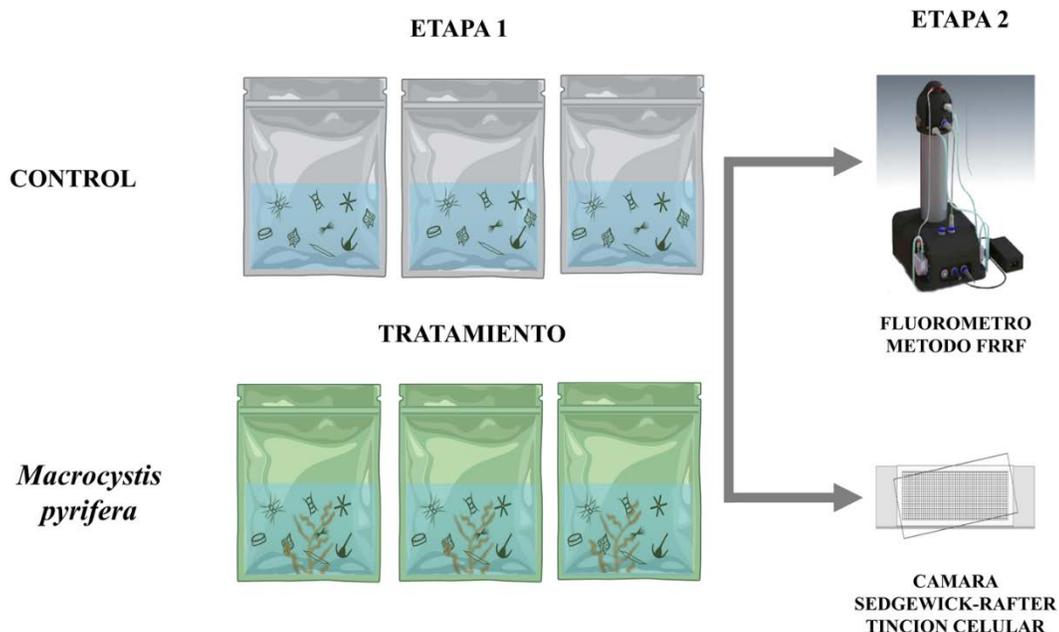
**Figura 16:** Esquema de trabajo experimental de mesocosmos para arcilla. Etapa 1: comunidad de fitoplancton colectado en el área del fiordo Comau (Estación Científica Huinay). Etapa 2: Tratamientos utilizados - Color blanco representa el control y rojo y amarillo, concentraciones experimentales utilizados (0,5 g/L). Etapa 3: validación de los datos obtenido con diversas técnicas.

### 8.1.2 Macroalgas

#### 1) Experimento de mesocosmos

La fase experimental tuvo como propósito evidenciar si las macroalgas producen compuestos alelopáticos en respuesta a la presencia de otros organismos en un sistema de cultivos, y si estos compuestos son capaces de afectar a las microalgas de una zona determinada.

El diseño experimental consistió en evaluar la producción de compuestos alelopáticos de las macroalgas sobre las microalgas del fiordo Comau (Región de Los Lagos). Para esto se obtuvo una macroalga del fiordo, *Macrocystis pyrifera* y un mesocosmos de microalgas del fiordo extraídos con una red de fitoplancton de 23  $\mu\text{m}$ . Se agregaron 25 g de macroalga a un envase de 6L junto a una densidad celular de fitoplancton de 2000 céls/mL y se evaluó el efecto a las 24 h. Cada mesocosmos a 23 de salinidad, fue instalado en el muelle de la Fundación Huinay (Fiordo Comau) exponiéndose a condiciones ambientales de movimiento de mareas, temperatura ambiental del fiordo y radiación. Se midió a las 24 h la eficiencia fotosintética, el pH y la viabilidad celular de los tratamientos. La identificación de fitoplancton fue agrupada en dos grandes grupos (dinoflagelados y diatomeas), y se buscaron especies centinelas que tuvieran el potencial de generar floraciones algales nocivas en el sistema (ej., *Pseudo-nitzschia* sp.) (Figura 17).



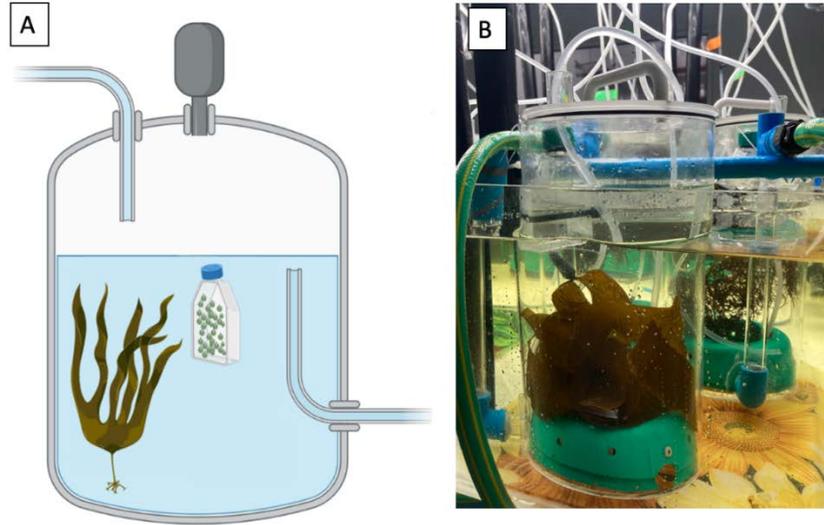
**Figura 17:** Esquema de trabajo experimental para compuestos alelopáticos desarrollado por macroalgas. Etapa 1: concentraciones celulares de cultivos de mesocosmos (2000 céls/mL) y cultivos de macroalgas en recipientes (producción de metabolitos secundarios o exudados). Etapa 2: validación de los datos obtenido con diversas técnicas analíticas.

## 2) Experimentos de monocultivo en un sistema de flujo continuo

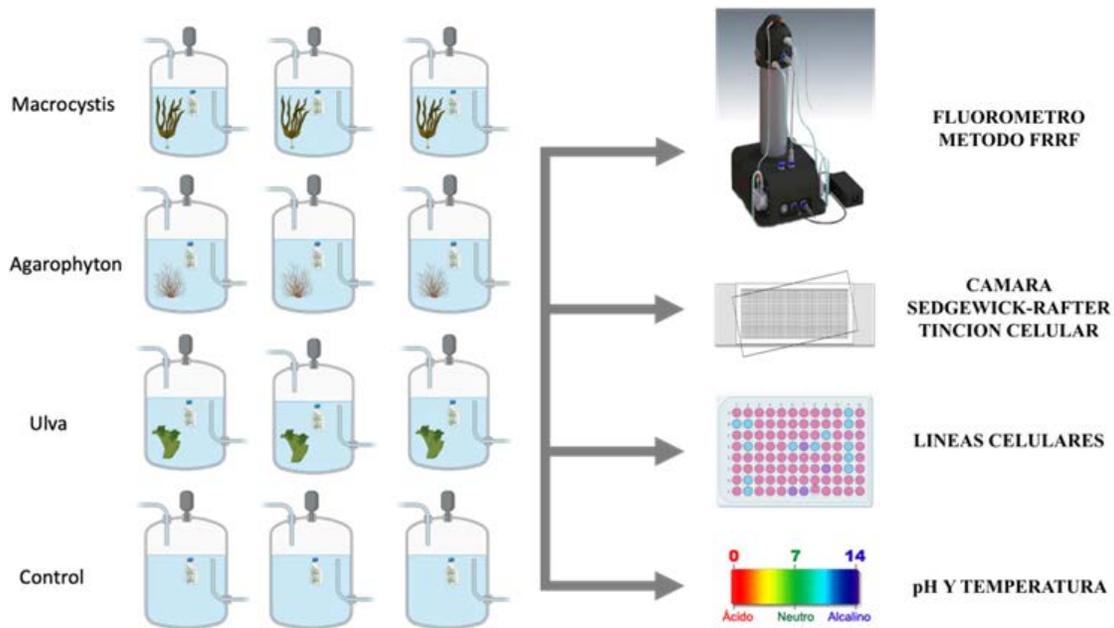
La fase experimental tuvo como propósito evidenciar si las macroalgas desarrollan compuestos alelopáticos en respuesta a la presencia de otros organismos en un sistema de cultivos, y si estos compuestos son capaces de afectar a las microalgas tóxicas objetivo de este estudio durante un evento de FAN.

El diseño experimental, consistió en evaluar la respuesta y producción de compuestos alelopáticos de las macroalgas sobre las microalgas. Para esto se elaboraron dos cultivos: 1) Macroalgas individuales (*Macrocystis pyrifera*, *Agarophyton chilense* y *Ulva* sp.) y las 3 especies de microalgas objetivo. Tanto las macroalgas como las microalgas fueron situadas en el mismo acuario de 3 L sin contacto directo, para lo cual el cultivo de microalgas fue situado en frascos de 50 mL dentro del acuario. Los frascos conteniendo las microalgas fueron confeccionados con insertos con filtro para permitir el intercambio de compuestos. Los frascos conteniendo *A. catenella* (Ac) y *K. selliformis* (Ks) fueron confeccionados con filtros de 10  $\mu\text{m}$  y con filtros de 5  $\mu\text{m}$  para los cultivos de *P. verruculosa* (Pv). El experimento se realizó con flujo continuo de 4-6 mL/min durante 24 h, en condiciones de 33 de salinidad,  $14 \pm 2$  °C y luz de 100  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con un fotoperiodo de 16:8 h (luz/oscuridad).

Cada especie de microalga fue sometida a las 3 especies de macroalgas y a un tratamiento sin macroalgas (control). Se midió la eficiencia fotosintética y el pH de los tratamientos a las 4, 20 y 24 h y la viabilidad celular se analizó a los 4 y 24 h. Al final del experimento se determinó la existencia de subproductos tóxicos realizando un ensayo de citotoxicidad utilizando la línea celular branquial RTgill-W1 (**Figura 18 y 19**).



**Figura 18:** Experimento de co-cultivo de macro-microalgas en un sistema de flujo continuo.(A) Esquema. (B) El sistema original.



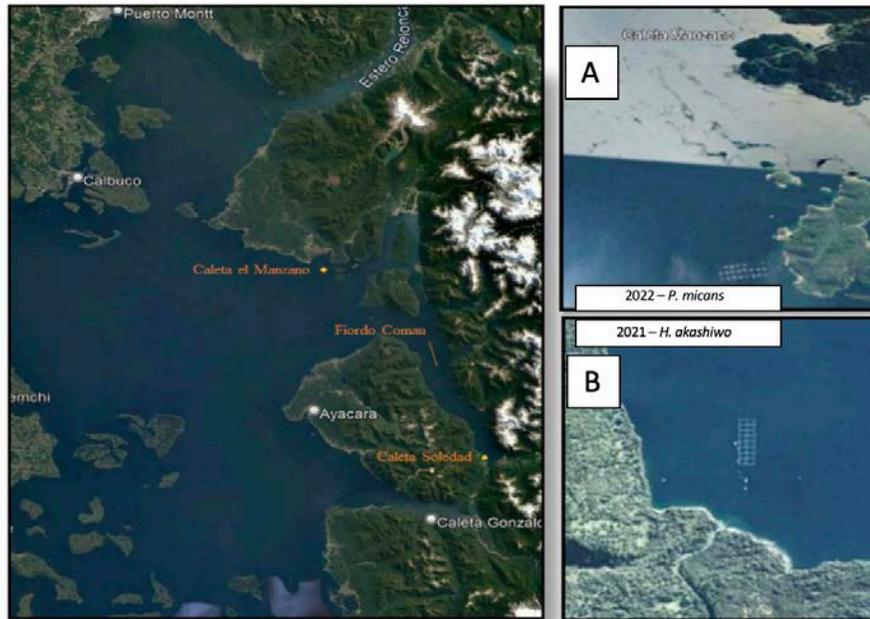
**Figura 19:** Esquema de trabajo experimental del co-cultivo de micro-macroalgas con flujo continuo. Etapa 1: concentraciones celulares de cultivos de 1000cél/s/mL y los cultivos de macroalgas en recipientes (producción de metabolitos secundarios o exudados). Etapa 2: validación de los datos obtenido con diversas técnicas analíticas.

### 8.1.3 Cortina de Burbujas

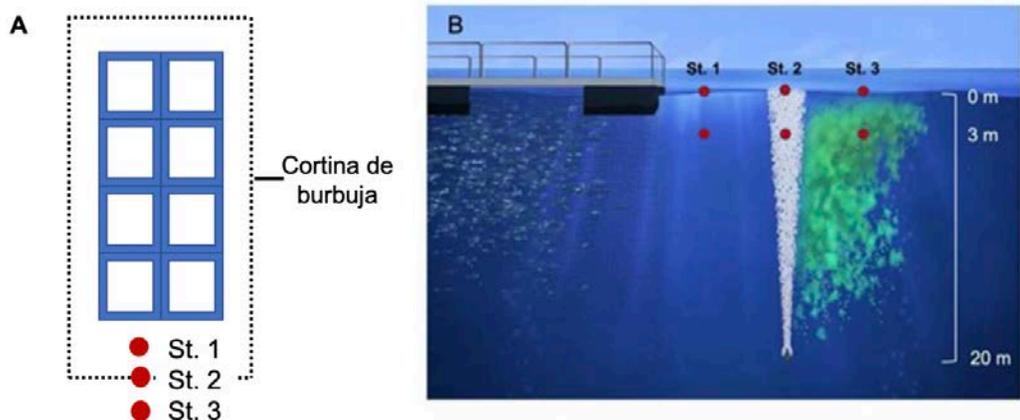
La fase experimental tuvo como propósito evaluar la efectividad del método de mitigación de cercos perimetrales de burbujas, durante los meses de verano a otoño entre los años 2021 – 2022 (enero - abril). Las áreas estudios se localizaron 1) El Centro Caleta Soledad (CERMAQ - 2021), fiordo Comau ( $42^{\circ}22'01.59''\text{S} - 72^{\circ}29'18.72''\text{O}$ ) y 2) el Centro Caleta el Manzano (CERMAQ), en el mar interior de Chiloé ( $42^{\circ}02'35.04''\text{S} - 72^{\circ}38'43.40''\text{O}$ ) (**Figura 20**). Durante estos periodos, se evaluó la efectividad y mecanismos de acción de las cortinas de burbuja para 1) bloquear la difusión celular horizontal y 2) si el sistema produce ruptura celular de los fitoplancton presente en el sistema, lo que potencialmente podría liberar sustancias líticas al medio acuático.

Para realizar las mediciones, se seleccionaron tres puntos de muestreo; 1) fuera de la cortina de burbujas; 2) sobre la cortina de burbujas y 3) en el interior de la cortina de burbujas (**Figura 21**). En el primer periodo de estudio en 2021, se caracterizó la columna de agua con un CTD-O-F SEIVAS Hydrometrie y se midió de la eficiencia fotosintética del fitoplancton con el equipo FRRF3. En el segundo periodo de estudio en 2022, se colectaron muestras discretas de fitoplancton (desde 0 a 15 m), se determinaron las características de la columna de agua con un CTD-O SeaBird 19Plus y se midió la eficiencia fotosintética con equipo FRRF3 (**Figura 22**).

Tanto en 2021 como en 2022, se trabajó en los 3 puntos de monitoreo con el sistema de cortinas de burbujas apagado ( $t_0$ ), y posteriormente se encendieron y se mantuvieron activas por un periodo superior a las 60 min antes de realizar un nuevo muestreo ( $t_1$ ). El sistema de burbujeo se mantuvo encendido por todo el periodo de muestreo en  $t_1$  (**Figura 22**).



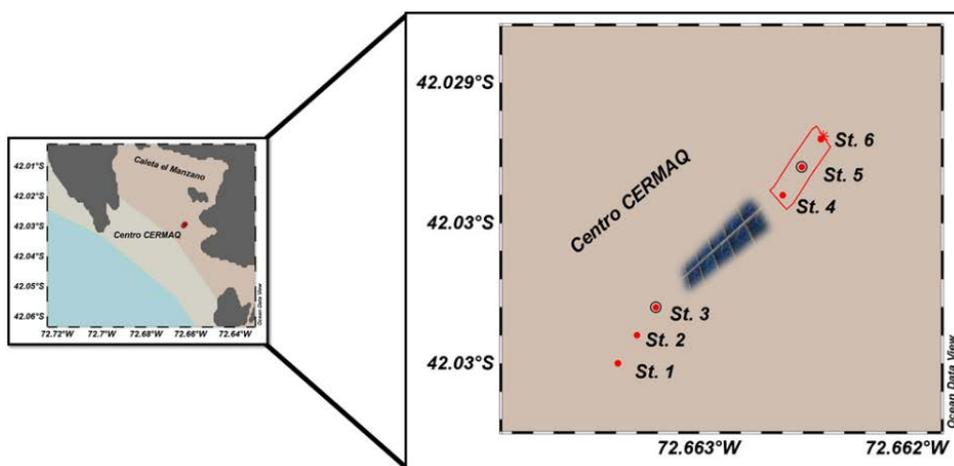
**Figura 20:** Área de estudio, centro de cultivo de salmónidos A) Caleta el Manzano (2022), B) Caleta Soledad (2021), ambos de la empresa Cermaq, Chile.



**Figura 21:** Esquemas que representan el posicionamiento y eficiencia de las cortinas de burbujas A) vista área, B) vista vertical de la columna de agua.



**Figura 22:** Centro Caleta Soledad (A), con un sistema de cortinas de burbujas (B) y equipo FRRF3 para medir la eficiencia fotosintética de los organismos fitoplanctónicos (C).



**Figura 23:** Visualización de las estaciones de muestreo utilizadas en centro de salmoneicultura de la empresa Cermaq en 2022.

### Objetivo específico 3

Evaluar la peligrosidad de los productos y sub-productos que se generan de la aplicación de los métodos de mitigación o inactivación celular en diferentes condiciones y escalas de tiempo.

## **Metodología**

Para determinar la peligrosidad de los productos y sub-productos que se generan de la aplicación de los métodos de mitigación o inactivación de FANs, se recopiló información sobre la peligrosidad, normas de emisión y bases internacionales de los productos utilizados, se revisaron bases de datos como EBSCO, Scopus, Web of Science (WoS), ScienceDirect, PubMed y el motor de búsqueda de Google. La metodología de recopilación de información se realizó mediante palabras “clave” que identifican investigaciones científicas referidas a la materia de estudio.

### **Objetivo específico 4**

Identificar brechas normativas y hacer recomendaciones de las condiciones para la utilización y fiscalización de los sistemas de eliminación en sistemas cerrados y del correcto uso de los sistemas de control en el medio natural, incluyendo una evaluación de volúmenes y costos.

## **Metodología**

Condiciones de aplicación de métodos de mitigación:

Establecer condiciones ambientales mínimas en las que los tratamientos seleccionados podrían ser aplicados para asegurar su eficacia y bajo impacto ambiental.

Para cumplir con esta actividad, se resumirán los resultados obtenidos en los experimentos que evaluaron los efectos de los biocidas: Luz ultravioleta (UV), peróxido de hidrógeno y dióxido de cloro sobre la viabilidad celular de especies FANs, viabilidad de líneas celulares branquiales y eficiencia fotosintética. Este resumen nos permitirá conocer las dosis necesarias de los biocidas para ser aplicados. Adicionalmente, estos resultados se contrastarán con las fichas confeccionadas en el objetivo 1 para cada biocida.

Recomendación de utilización de métodos:

Efectuar recomendaciones de utilización de los sistemas seleccionados, considerando aspectos operativos, de salud y de protección al medio ambiente. Este objetivo será desarrollado en profundidad hacia el final del proyecto cuando se tenga toda la información obtenida de las actividades experimentales y su comparación con la literatura disponible.

## RESULTADOS

### 9.1 Objetivo específico 1

Describir y comparar los sistemas de mitigación o inactivación de células de microalgas tóxicas a nivel mundial para evitar su dispersión y efectos nocivos y/o tóxicos en ambientes naturales con el fin de seleccionar los métodos que pudieran adaptarse a las necesidades nacionales.

#### 9.1.1 Confección de fichas

Para la confección de las fichas comparativas se revisaron las bases de datos que agrupan todas las revistas científicas indexadas mediante el buscador de la *Web of Science* (WoS, ex ISI), EBSCO, *ScienceDirect* y también del motor de búsquedas de Google Académico. Para la búsqueda de artículos, informes se utilizó una serie de palabras y/o frases clave para poder filtrar la información. Dentro de las palabras claves utilizadas tenemos:

- *Harmful Algal Bloom*
- *Mitigation + Harmful Algal Bloom*
- *Harmful Algal Bloom + Chile*
- *HABs Mitigation*
- *Modifed Clay + phytoplankton*
- *Modifed Clay + HAB*
- *Hydrogen peroxide + HAB*
- *Chlorine dioxide + Phytoplankton*
- *Chlorine dioxide + HAB*

Además de búsquedas genéricas en Google que incluían estas “*key words*” más los

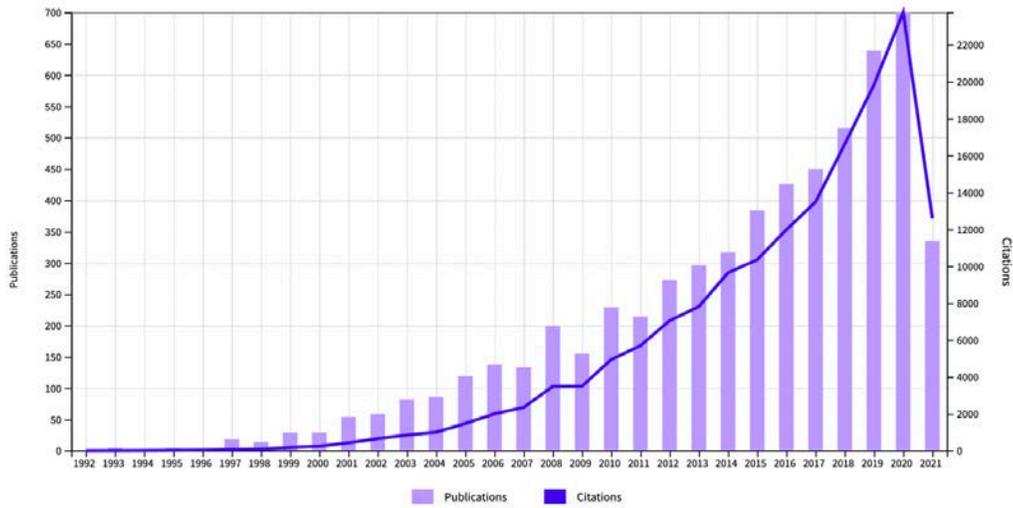
nombres científicos de las microalgas de interés para el presente estudio.

Una vez realizadas las búsquedas, se procedió a evaluar si los artículos encontrados eran atinentes a la problemática estudiada, para eso se eliminaron todos aquellos escritos que trataran sobre investigaciones en microalgas de agua dulce, revisiones bibliográficas que no aportaran información nueva y artículos o notas de prensa sin referencias bibliográficas. En el archivo Excel, anexo 1.xls, que se encuentra en la carpeta de información adjunta, se incluye la lista de todos los artículos considerados para la elaboración de las fichas. Las referencias bibliográficas utilizadas en cada ficha se encuentran asignadas a un número de cita contenido en el anexo 1.

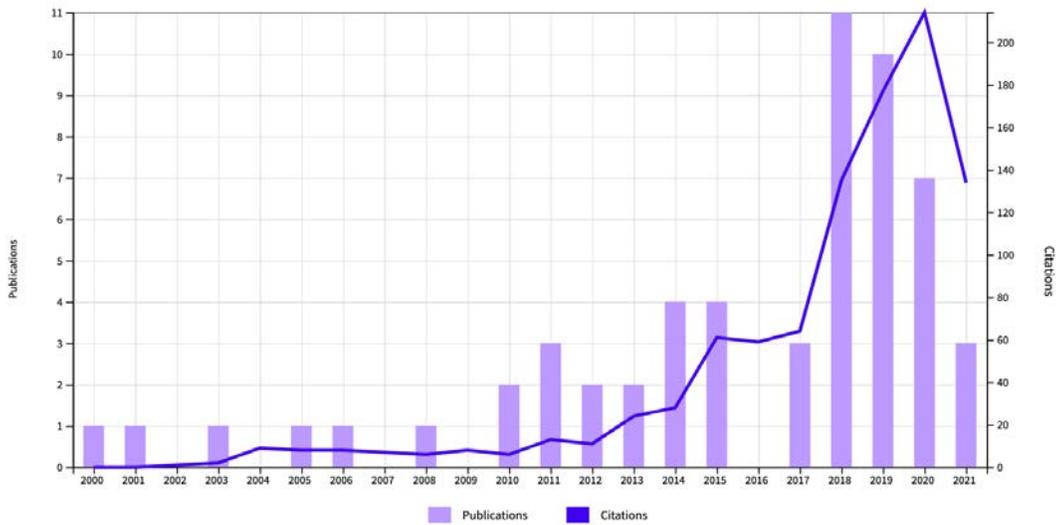
A partir de la base de datos de Web of Science (WoS) se generaron gráficos específicos para cada motor de búsqueda (palabras claves). En donde se observa que en los últimos 30 años el número de publicaciones y citas sobre la temática “*Harmful Algal Bloom*” ha ido en aumento, alcanzando solo en el 2020 un número de 700 publicaciones y más de 22000 (**Figura 24**). Mientras que el número de citas y de publicaciones en la temática “*Harmful Algal Bloom + Chile*” tiene la misma tendencia de crecimiento a lo largo de los años, alcanzando en el año 2020 11 publicaciones y más de 200 citas (**Figura 25**).

Por otro lado, en el motor de búsqueda “*Mitigation + Harmful Algal Bloom*” y “*HABs Mitigation*” se observa un crecimiento de las publicaciones y citas en esta temática a lo largo de los años (**Figura 26 y 27**). Tan solo el año 2020 se publicaron cerca de 40 y 20 estudios, y se citó más de 1300 y 500 publicaciones, respectivamente.

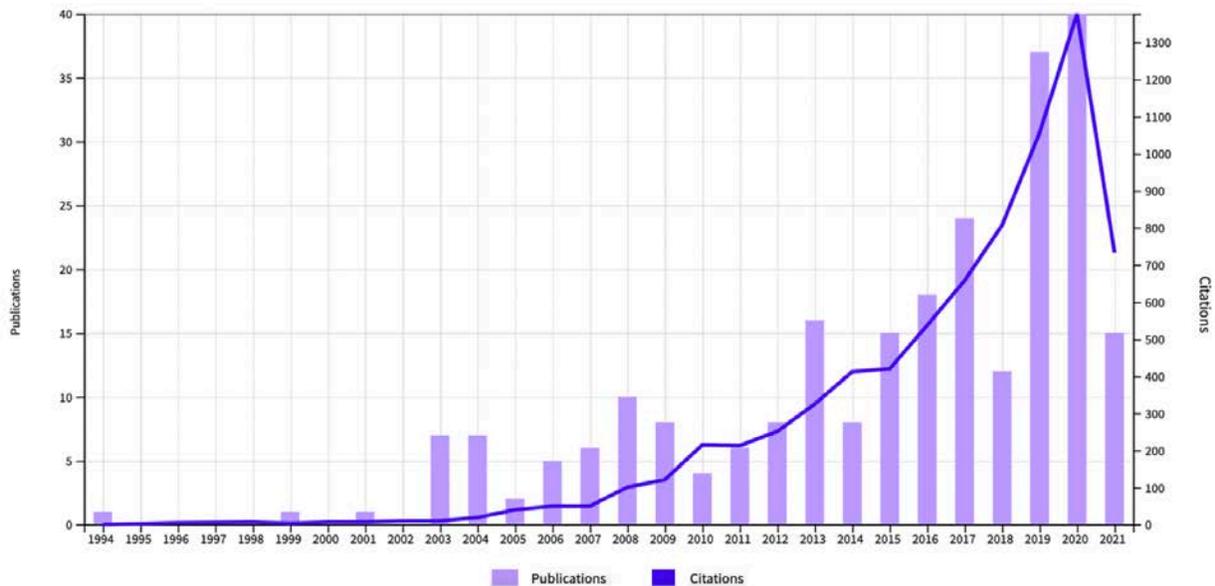
Posteriormente, se enfocó la búsqueda en el tipo de mitigación de arcillas modificadas. Se observa un aumento en el año 2016 de las publicaciones asociados a la temática “*Modified Clay + Phytoplankton*” y el número de citas desde ese año a la actualidad ha variado en el rango de 70-100 citas (**Figura 28**). Por otro lado, en la temática “*Modified Clay + HAB*” se observa un crecimiento de las citas desde el 2016 a la actualidad (**Figura 29**).



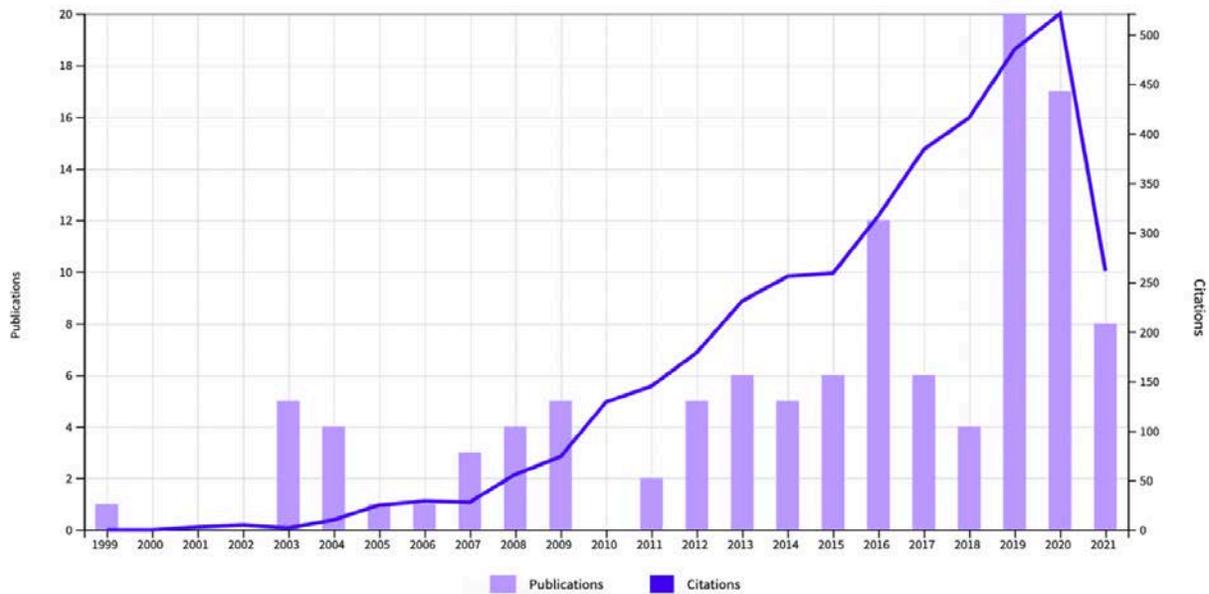
**Figura 24:** Número de citas y publicaciones del tema “*Harmful Algal Blooms*” desde el año 1992. Gráfico obtenido desde Web of Science (WoS), utilizando búsqueda en tópico.



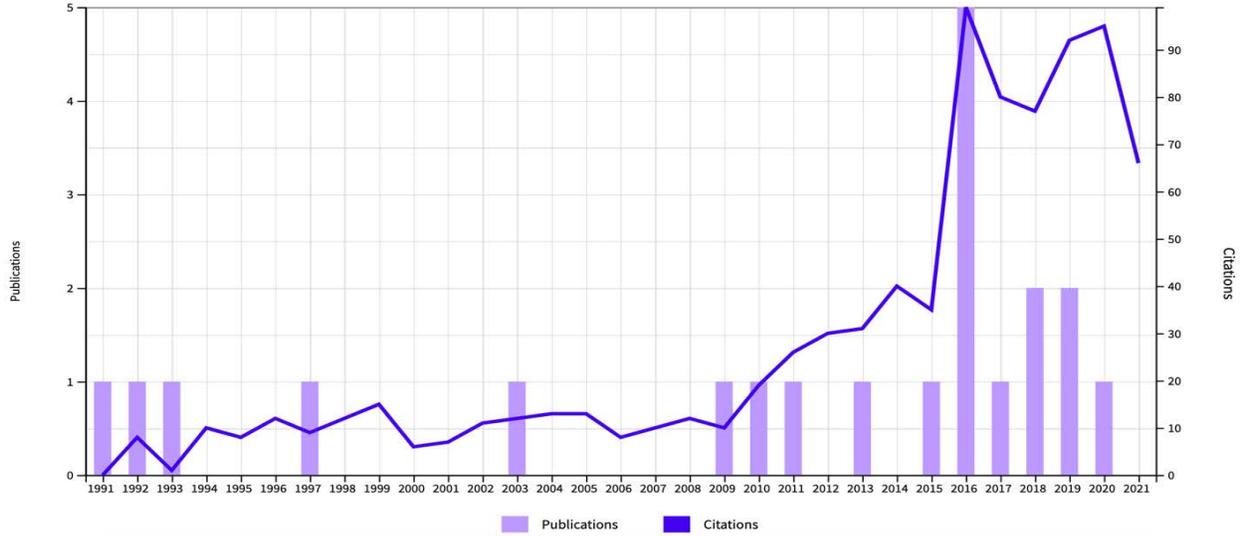
**Figura 25:** Número de publicaciones y citas del tema “*Harmful Algal Blooms + Chile*” desde el año 2000. Gráfico obtenido desde Web of Science (WoS), utilizando búsqueda en tópico.



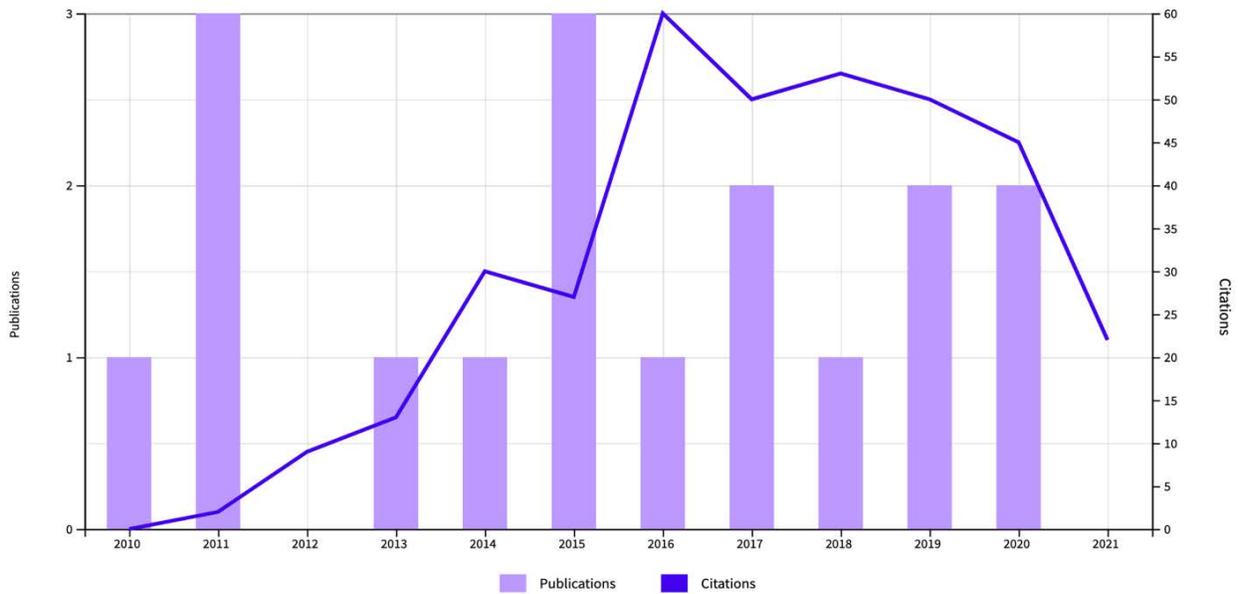
**Figura 26:** Número de citas del tema “*Mitigation + Harmful Algal Blooms*” desde el año 1994. Gráfico obtenido desde Web of Science (WoS)



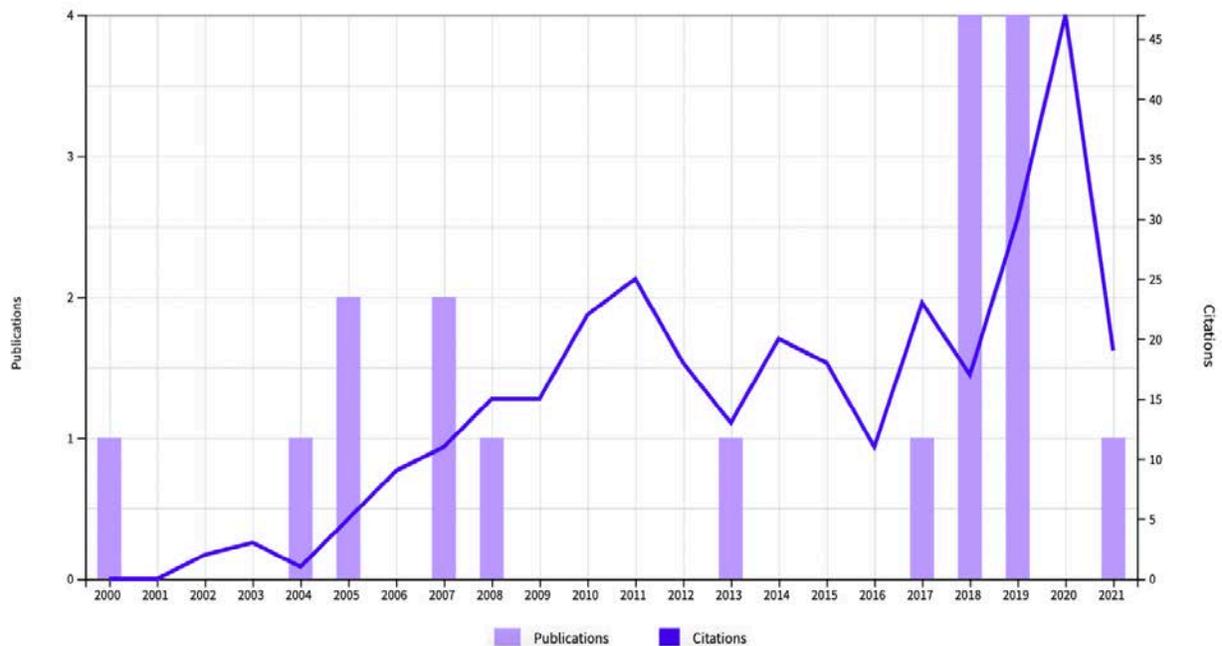
**Figura 27:** Número de citas y publicaciones del tema “*HABs Mitigation*” desde el año 1999. Gráfico obtenido desde Web of Science (WoS), utilizando búsqueda en tópico.



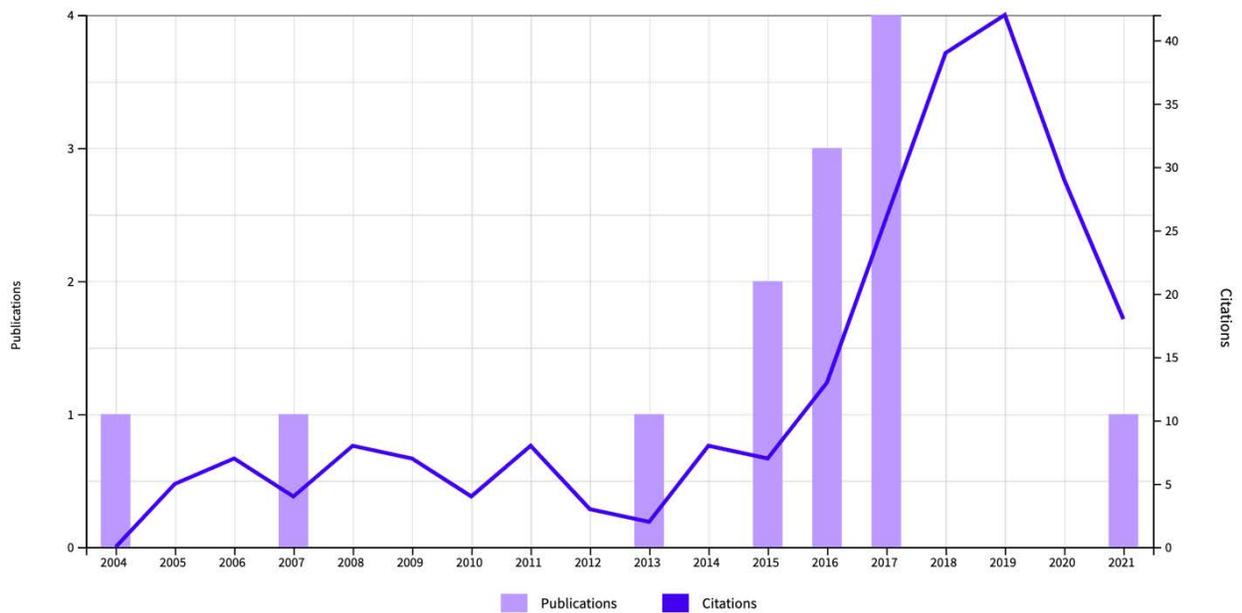
**Figura 28:** Número de citas y publicaciones del tema “Modified Clay + Phytoplankton” desde el año 1991. Gráfico obtenido desde Web of Science (WoS), utilizando búsqueda en tópico.



**Figura 29:** Número de citas y publicaciones del tema “Modified Clay + HAB” desde el año 2010. Gráfico obtenido desde Web of Science (WoS), utilizando búsqueda en tópico.



**Figura 30:** Número de citas y publicaciones del tema “Hydrogen peroxide + HAB” desde el año 2000. Gráfico obtenido desde Web of Science (WoS), utilizando búsqueda en tópico.



**Figura 31:** Número de citas y publicaciones del tema “Chlorine dioxide + Phytoplankton” desde el año 2004. Gráfico obtenido desde Web of Science (WoS), utilizando búsqueda en tópico.

Finalmente, se enfocó la búsqueda en los sistemas de mitigación químicos, tales como peróxido de hidrogeno y dióxido de cloro, donde se observa que tanto en la búsqueda de “Hydrogen peroxide + HAB” como para “Chlorine dioxide + Phytoplankton” tienden a aumentar las citas y publicaciones en los últimos 5 años, llegando a su máximo con más de 45 y 40 citas, respectivamente, el año 2020 (**Figura 30 y 31**). Por otro lado, el tema de búsqueda de “Chlorine dioxide + HAB” solo generó resultados de una publicación con seis citas acumuladas desde el 2018 a la fecha.

### 9.1.2 Patentes

Para la búsqueda de patentes, sea tanto de tipo para productos, como de procedimientos (metodología de aplicación) y/o prototipos (herramientas electromecánicas, dispositivos), se utilizó el motor de búsquedas de “Google Patents” (<https://patents.google.com/>).

La búsqueda de información dentro de esta herramienta después de ingresar los criterios de búsqueda puede filtrarse según la Oficina donde se formalizó el trámite de la patente (se entiende como país), el idioma en el cual fue ingresa la patente, el estatus de esta (concedida o de aplicación), el tipo (patente o diseño) e incluso si hay asociadas litigaciones al respecto que permitan indicar si dicha patente pudiera estar en alguna disputa legal. Para el motor de patentes los términos de búsqueda utilizados fueron:

- *Harmful Algal Bloom*
- *Modified clay + Harmful algal Bloom*
- *Hydrogen peroxide + Harmful algal bloom*
- *Chlorine dioxide + Harmful algal Bloom*

Una vez realizadas las búsquedas los resultados indican que bajo el criterio de “Harmful algal Bloom”, se encuentran asociadas un total de 39.037 resultados, de los cuales 11.692 patentes se encuentran a la fecha con estado de concedidas (granted según su terminología en inglés), y de estas patentes concedidas, la mayoría ha sido ingresada en

idioma inglés (9.344), y un número no menor se encuentran ingresadas en idioma Chino (767). Estas últimas no permiten análisis de ningún tipo dado que los traductores online de chino no son del todo asertivos. El resto de las patentes se encuentra ingresada en otros idiomas.

Al utilizar los criterios de búsqueda que incluían algún tratamiento, resalta entre todos la cantidad de patentes encontradas para las arcillas modificadas, para este criterio (“modified clay + harmful algal Bloom”) encontramos un total de 3.920 patentes, de las cuales aproximadamente un tercio (1.243) tiene un estado de concedidas, siendo el método de mitigación con mayor cantidad de patentes existentes. Dado que el peróxido de hidrógeno es un compuesto utilizado en números procesos industriales, y además puede generarse producto del estrés oxidativo en las células, es que no se hizo posible incluir ese criterio de búsqueda como resultado, de hecho, la cantidad de patentes asociadas a este término es varias veces superior que cuando se utiliza por si solo el término “Harmful algal Bloom”. De la misma forma, tampoco es posible utilizar los resultados de búsqueda para el dióxido de cloro, dado que ocurre lo mismo que lo ya explicado para el peróxido de hidrógeno.

Ahora, al analizar los resultados más de cerca, se puede observar que el motor de búsqueda de patentes de Google es altamente inespecífico, incluso incluyendo dentro de los resultados patentes que ni siquiera contienen ninguno de los términos de búsqueda dentro de título, sino que incluso aquellos contenidos en la documentación de cada patente, no permitiendo sacar conclusiones inmediatas. Un análisis posterior, luego de descargar el listado completo de búsqueda según el criterio “Harmful Algal Bloom” permitió filtrar los datos para aquellas patentes que contengan en el título mismo de la patente (nombre de la patente) alguno de los siguientes términos:

- *Harmful Algal Bloom*
- *Algal*
- *Clay*

- *Phytoplankton*
- *Bloom*
- *Tide*

La sub-búsqueda nos permitió encontrar que únicamente existen 473 patentes que se encuentran asociadas a estos términos específicos de búsqueda respecto del nombre bajo el cual la patente ha sido ingresada, de las cuales solo 177 (**Tabla 1**) se encuentran actualmente con el estatus de concedida (“granted”). Cabe destacar que, de todas las patentes concedidas, la propiedad intelectual está fuertemente agrupada en solo 3 países que concentran la mayoría de las inscripciones, estos son China, Corea y EE.UU., con 104, 44 y 19 patentes respectivamente, el resto de las patentes se las dividen Australia, Europa (inscritas en la oficina de patentes Europeas), España, Japón y Rusia con 2, 4, 1, 2, 1 respectivamente.

Finalmente es importante mencionar que, para poder filtrar correctamente los datos, al utilizar el criterio “tide”, luego se tuvieron que eliminar las entradas que contuvieran los términos peptide, polypeptide y nucleotide que no guardaran relación con la temática de las FAN.

**Tabla 1.** Listado completo de patentes encontradas y analizadas, para distinguir al país de origen se debe prestar atención a las primeras dos letras del código de cada patente. AU = Australia; CN = China; EP = Europa; ES = España; JP = Japón; KR = Corea; RU = Rusia; US = Estados Unidos. Como referencia en la última columna esta el año en el cual la patente fue concedida al solicitante. Continúa en las páginas consecutivas.

<b>Código</b>	<b>Título</b>	<b>Fecha de concesión</b>
<b>AU-2020103356-A</b>	Method and device for building river diatom bloom warning model	1/21/21
<b>AU-783112-B2</b>	Algal toxin	9/22/05

<b>CN-100384757-C</b>	Method for preventing and controlling eutrophic water bloom in drinking water source	4/30/08
<b>CN-100402641-C</b>	Aerogenic enteric bacilli secreting alga-dissolving substance and its uses in <i>myxophyceae</i> algal tufa	7/16/08
<b>CN-100519438-C</b>	Method for processing red tide with sulphuric acid free radical	7/29/09
<b>CN-100581380-C</b>	Method for obtaining free amino acid by the hydrolyzation of water bloom blue algae	1/20/10
<b>CN-101134615-B</b>	Method for treating freshwater bloom by magnetic control modified coal ash and flocculating agent	9/22/10
<b>CN-101219828-B</b>	Blue algae water bloom bioflocculation agent and production	6/23/10
<b>CN-101229933-B</b>	Apparatus for treating algae blooming by using clay and method of use thereof	09/08/10
<b>CN-101234804-B</b>	Assembly type water bloom or red current treatment workbench	08/08/12
<b>CN-101289240-B</b>	Novel finishing agent for removing algal tufa and treatment method	3/16/11
<b>CN-101337758-B</b>	Method for anaerobic fermentation of bloom blue algae	9/14/11
<b>CN-101358172-B</b>	Culture method of golden algae and application thereof in controlling water-bloom algae aspect	11/09/11
<b>CN-101362612-B</b>	Algal bloom pretreatment technology method through rare-earth magnetic disc in water-supply plant	12/22/10
<b>CN-101456603-B</b>	Method for treating eutrophication reservoir bloom	12/08/10
<b>CN-101591040-B</b>	Method for preventing and controlling water bloom pollution organisms in eutrophicated water body	02/09/11
<b>CN-101653719-B</b>	Method for in-situ pillared modification of bentonite and algal-removing water purifying agent	1/25/12
<b>CN-101717132-B</b>	All-around ultrasonic wave algal removal floater	5/25/11

<b>CN-104429910-B</b>	Method for forming cyanophytamicrocystis water blooms with tap water as initial water source	05/03/17
<b>CN-104839158-B</b>	A kind of flavones is sustained the preparation method of algal control preparation	6/23/17
<b>CN-104844507-B</b>	Application of the quinolinones compound in algal grown is suppressed and the algicide for suppressing algal grown	26/12/17
<b>CN-105112338-B</b>	A method of utilizing lake blue algae wawter bloom culture planktonic green algae	1/22/19
<b>CN-105129951-B</b>	Preparation method of modified alga flocculating agent, and application of alga flocculating agent in treatment of cyanobacterial bloom	3/22/17
<b>CN-105198568-B</b>	A method of artificial soil is synthesized based on algal gel	17/18/18
<b>CN-105236539-B</b>	A kind of efficient modification clay for eliminating red tide	7/20/18
<b>CN-105381641-B</b>	Intelligent water bloom removing system and method suitable for bend water body	05/03/17
<b>CN-105502600-B</b>	application of nitric oxide gas in controlling cyanobacterial bloom	12/13/19
<b>CN-105766776-B</b>	Beach river crab cultivation pond blue-green alga bloom salvages machine automatically	04/10/2018
<b>CN-105907687-B</b>	Method for culturing photosynthetic bacteria by using water bloom algae as matrix	2/18/20
<b>CN-106047786-B</b>	A kind of method of quick raising algal cysts yield	4/30/19
<b>CN-106577790-B</b>	The method extracted algistatic activity ingredient from purslane and be used for algal control	03/08/19
<b>CN-106745574-B</b>	Slow-release algal control control algae agent	10/15/19
<b>CN-106754385-B</b>	Method for cultivating chlorella phytoplankton by using cyanobacterial bloom as raw material	05/05/20
<b>CN-107047626-B</b>	Method and its algal control application that algistatic activity ingredient prepares algae-inhibiting agent are extracted from semen abutili	7/19/19

<b>CN-107986412-B</b>	Modified clay system for controlling harmful algal blooms in aquaculture water	11/03/20
<b>CN-108128867-B</b>	Ultrasonic modification method for improving efficiency of clay in treatment of harmful algal blooms	4/27/21
<b>CN-108675454-B</b>	Method for controlling whole process of blue algae bloom development in large shallow lake	10/30/20
<b>CN-109164208-B</b>	Green tide outbreak environment simulation method and device	3/31/20
<b>CN-109657200-B</b>	Method for determining burst probability of cyanobacterial bloom in lake reservoir	10/23/20
<b>CN-109735455-B</b>	Culture method for growth of diatom in cyanobacterial microcystis bloom	8/25/20
<b>CN-110328072-B</b>	Spraying device for harmful algal bloom removing agent	29/1/21
<b>CN-111204817-B</b>	Magnetic composite carbon prepared from harmful algal bloom and plastic and preparation method thereof	06/01/21
<b>CN-111232974-B</b>	Composite active carbon prepared from harmful algal bloom and tire powder and preparation method thereof	03/05/21
<b>CN-1164504-C</b>	Method for treatment of sea red tides and freshwater bloom	09/01/04
<b>CN-1206174-C</b>	Microbe capable of degradation removing microcystin from water bloom	6/15/05
<b>CN-1241841-C</b>	Technique for harnessing water bloom and bed mud secondary pollution using lake sediment	2/15/06
<b>CN-201315152-Y</b>	Energy transducer structure for ultrasonic algal removing device	9/23/09
<b>CN-201358186-Y</b>	Algal-phase adjustment device	12/09/09
<b>CN-201569904-U</b>	Real-time monitoring device for cyanobacterial bloom	09/01/10
<b>CN-201615902-U</b>	Bloom warning system	10/27/10
<b>CN-201777893-U</b>	Layer-breaking water bloom eliminator	3/30/11

<b>CN-201907997-U</b>	Device for treating red tide with oxygen active particles	7/27/11
<b>CN-202576162-U</b>	Device capable of preventing and controlling water intake algal bloom in water source area	12/05/12
<b>CN-202583160-U</b>	Water bloom alga vertical migration simulation experiment device	12/05/13
<b>CN-202870073-U</b>	Algal bloom early warning buoy system	04/10/13
<b>CN-203612991-U</b>	Algal bloom controller	5/28/14
<b>CN-203613015-U</b>	Device for eliminating algal toxins in waters with ultraviolet light microozone technology	5/28/14
<b>CN-203613060-U</b>	Device for eliminating algal toxins in water bodies	5/28/14
<b>CN-203860188-U</b>	Green tide enclosure experimental device	10/08/14
<b>CN-204111536-U</b>	The treatment system of a kind of algae blooms water source water	1/21/15
<b>CN-204689698-U</b>	A kind of device being applicable to clay method improvement algal tufa	10/07/15
<b>CN-205106054-U</b>	Clear away device of pond wawter bloom	3/30/16
<b>CN-205475149-U</b>	Two boat form wawter bloom clearing devices	8/17/16
<b>CN-205620400-U</b>	Algal tufa early warning device based on chla concentration	10/05/16
<b>CN-205671266-U</b>	Beach river crab cultivation pond blue-green alga bloom salvages machine automatically	11/09/16
<b>CN-205786237-U</b>	Algal tufa on-line monitoring system based on flow cytometry	12/07/16
<b>CN-205861667-U</b>	A kind of for preventing the water quality detecting device of the green tide of reservoir	01/04/17
<b>CN-205974061-U</b>	A pipe -line system for but, microalgal culture's make full use of water resource	2/22/17

<b>CN-206557193-U</b>	Portable water phytoplankton migration rate determines device	10/13/17
<b>CN-206720795-U</b>	Wawter bloom governing system	12/08/17
<b>CN-206872496-U</b>	Algae flusher is killed in a kind of wawter bloom control for adapting to large-sized deep water water body	01/12/18
<b>CN-207877316-U</b>	A kind of processing unit of cyanobacterial bloom	9/18/18
<b>CN-208212712-U</b>	A kind of phytoplankton high-efficiency sedimentation device	12/11/18
<b>CN-208251043-U</b>	A kind of double-boat type wawter bloom remove device	12/18/18
<b>CN-208334198-U</b>	Phytoplankton & Suspension red tide and its toxicity detection optics home position sensing	01/04/18
<b>CN-208511983-U</b>	A kind of water body algal tufa emergency cancellation element	2/19/19
<b>CN-208577998-U</b>	The quick defeated shifting disposal plant of water temperature delamination reservoir bloom	03/05/19
<b>CN-208588727-U</b>	Experimental provision for field algal culture and water sampling	03/05/19
<b>CN-208803069-U</b>	Green tide breaks out environment simulator and system	4/30/19
<b>CN-209210552-U</b>	A kind of filter algae fluidic device administered for wawter bloom	08/06/19
<b>CN-209858471-U</b>	Device for on-line monitoring algal bloom in water body	12/27/19
<b>CN-210825525-U</b>	Device and system for preventing and treating water bloom	6/23/20
<b>CN-211226459-U</b>	Water bloom treatment device combining ultrasonic wave and micro-bubble air flotation	08/11/20
<b>CN-212476280-U</b>	Algal bloom suppression device	02/05/21

<b>CN-212484569-U</b>	Gathering device for blue algae bloom early warning in lake reservoir	02/05/22
<b>CN-2583080-Y</b>	UV controlling device for preventing 'water bloom' and 'red tide'	10/29/03
<b>EP-1250292-B1</b>	Process to prevent microorganisms blooming in an aquatic system	13/03/03
<b>EP-2663614-B1</b>	Integrated coal to liquids process and system with co2 mitigation using algal biomass	08/07/19
<b>EP-3068732-B1</b>	Method for controlling algal bloom	11/29/17
<b>EP-3331367-B1</b>	Non-bloom comestible product	11/04/20
<b>ES-2445623-T3</b>	Microcapsules and emulsions containing low Bloom gelatin and methods for manufacturing and using them	03/04/14
<b>JP-3516548-B2</b>	Methods to control and remove water bloom	04/05/04
<b>JP-3841336-B2</b>	How to use phytoplankton	11/01/06
<b>KR-100248911-B1</b>	Method of destroying redtide generating plankton by using alpha-mannosidase	15/03/00
<b>KR-100252381-B1</b>	System for automatically alarming of arrival of harmful algal blooms and for preventing incoming of the sea water thereafter	4/15/00
<b>KR-100317889-B1</b>	Agent for preventing red-tide	12/22/01
<b>KR-100341799-B1</b>	Method for making red tide killing solutions with acid water or a mixture of acid water and alkali water from electrolyzed sea water with loess	6/26/02
<b>KR-100413628-B1</b>	Metal peroxide composition for removal and prevention of green tide	12/31/03

<b>KR-100460024-B1</b>	Red Tide Organism Removal Reagent Containing Active Agent in Zeolite Powders	12/14/04
<b>KR-100495271-B1</b>	The algicidal effect of red pigment produced by <i>Hahella chejuensis</i> 96CJ10356 strain and a method for production of red pigment having algicidal effect therefrom	6/14/05
<b>KR-100500651-B1</b>	A Apparatus for Growing Red-tide Organisms and Heterotrophic Protistan Grazers in Large Scales	07/12/05
<b>KR-100543747-B1</b>	Fermented solution ijsd for green tide extermination using <i>Chasmodon speciosa</i> fruits	1/23/06
<b>KR-100610527-B1</b>	Products of complex materials for the prevention of cyanobacterial bloom	08/09/06
<b>KR-100636999-B1</b>	The red tide, green tide, water and soil improvement agent and its manufacturing method	10/20/06
<b>KR-100651007-B1</b>	New material for mitigation of harmful algal blooms by using rock powder and organo-bentonite	11/29/06
<b>KR-100903691-B1</b>	Cultivation apparatus of living organism to cause red tide and its predator	6/18/09
<b>KR-101338038-B1</b>	Apparatus for monitoring red tide and green tide occurrence	12/06/13
<b>KR-101338039-B1</b>	Process for remote monitoring red tide and green tide occurrence	12/06/13
<b>KR-101384971-B1</b>	Early warning, forecasting and removal of blue-green algal blooming apparatus and method	4/16/14
<b>KR-101410698-B1</b>	an apparatus for removing phosphorus and using in preventing algae blooming	6/24/14
<b>KR-101446037-B1</b>	Remote monitoring system of water temperature per depth, red and green tide occurrence with lidar and process for monitoring thereof	10/01/14

<b>KR-101504044-B1</b>	Remote monitoring system of red and green tide occurrence with high power lazer assembly and cooling system thereof	3/24/15
<b>KR-101517728-B1</b>	Apparatus for monitoring red tide and green tide occurrence	5/15/15
<b>KR-101562652-B1</b>	the water turns over device for removing algae and the algae bloom control method using thereof	10/30/15
<b>KR-101617833-B1</b>	the water turns over device for removing algae and the algae bloom control method using thereof	05/03/16
<b>KR-101618625-B1</b>	Algal homogenization apparatus and method for operating thereof	05/12/17
<b>KR-101619777-B1</b>	Removing agent of green tides and red tides	05/12/18
<b>KR-101629202-B1</b>	Ship for removing green or red tides using plasma	05/10/19
<b>KR-101657171-B1</b>	composition for removing red tide and green algae, method for improving water quality using the same	9/19/16
<b>KR-101675320-B1</b>	Marine bacteria having excellent algicidal activity and method for removing red tide using the same	11/14/16
<b>KR-101699631-B1</b>	Removing agent of green tides and manufacturing the same	1/24/17
<b>KR-101701092-B1</b>	Red tide removal materials	1/31/17
<b>KR-101703850-B1</b>	Environment-friendly water-bloom adsorbent using heat-treated wood and manufacturing method thereof	02/08/17
<b>KR-101737354-B1</b>	Method and system for detection of algal patches floating on sea surface using satellite imagery	5/19/17

<b>KR-101742789-B1</b>	Red tides and water bloom Remedial Method utilizing salvation substance Consisting of ocher and cockle shell in accordance with algal concentration	6/27/17
<b>KR-101830586-B1</b>	Microalgal compositions for controlling red tides comprising Takayama genus and Method of using the same	2/21/18
<b>KR-101855591-B1</b>	water bloom apparatus	05/08/18
<b>KR-101863123-B1</b>	System for mapping river water-bloom map using automatic driving unmanned air vehicle and unmanned floating body of moving type	06/01/18
<b>KR-101929232-B1</b>	River water storing system having dredged soil scattering equipment for pondage insurance and water-bloom management	12/14/18
<b>KR-101929755-B1</b>	water-bloom removal system	12/17/18
<b>KR-101941575-B1</b>	Method for removal of algal bloom using copper nano	04/12/19
<b>KR-101971508-B1</b>	Portable tool for diagnosis algal-bloom	4/23/19
<b>KR-102119276-B1</b>	Device and method for predicting harmful algal bloom	06/05/20
<b>KR-102143114-B1</b>	Filtering type water treatment apparatus for removing algal bloom and organic pollutant	08/12/20
<b>KR-102186238-B1</b>	Composition for controlling red tide comprising Cyclo (Ala-Gly) as effective component and uses thereof	12/03/20
<b>KR-102190912-B1</b>	Real time water-bloom measurement system-based internet of things	12/15/20
<b>KR-102247482-B1</b>	Removal apparatus for water-bloom and floating waste	05/03/21
<b>RU-2370458-C2</b>	Method of water cyanobacteriae bloom control	10/20/09
<b>US-10488344-B2</b>	System for rapid assessment of water quality and harmful algal bloom toxins	11/26/19

<b>US-10787489-B2</b>	Biocatalyst comprising photoautotrophic organisms producing recombinant enzyme for degradation of harmful algal bloom toxins	9/29/20
<b>US-10822258-B2</b>	Device and method for treating harmful algal blooms using modified clay	11/03/20
<b>US-10906827-B2</b>	Systems and methods for reducing algae blooms and microbial growth by phosphorus removal from aqueous systems	02/02/21
<b>US-4595505-A</b>	Method for suppressing algal growth in solar ponds	6/17/86
<b>US-5352709-A</b>	Algal plastics	10/04/94
<b>US-6297193-B1</b>	Algal growth or microbial proliferation inhibitors and use thereof	10/02/01
<b>US-6544928-B2</b>	Virus capable of specifically infecting, growing within, and lysing red tide plankton; a method and an agent for preventing red tide using the virus; a method for isolating the virus; and a method for subculturing the virus	04/08/03
<b>US-6969530-B1</b>	Microcapsules and emulsions containing low bloom gelatin and methods of making and using thereof	11/29/05
<b>US-7236248-B2</b>	Optical phytoplankton discriminator	6/26/07
<b>US-7758752-B2</b>	Composite material and method for removing harmful algal blooms and turning them into submerged macrophytes	7/20/10
<b>US-7797109-B2</b>	Method for determining and reporting the presence of red tide at beaches	9/14/10
<b>US-8003778-B1</b>	Detection of red tide organisms by nucleic acid amplification	8/23/11
<b>US-8476196-B2</b>	Control of harmful algal blooms by induction of programmed cell death	07/02/13
<b>US-8685888-B2</b>	Method and agent for the remediation of algal blooms	04/01/14

<b>US-9458411-B2</b>	Lipid-based wax compositions substantially free of fat bloom and methods of making	10/04/16
<b>US-9624116-B2</b>	Systems and apparatus for removal of harmful algae blooms (HAB) and transparent exopolymer particles (TEP)	4/18/17
<b>US-9969968-B2</b>	Hydrodynamic separation (HDS) for removing protist predators from algal crops	5/15/18

### 9.1.3 Sistemas de mitigación

Las medidas de mitigación son utilizadas una vez que ya inicio un evento de FAN, y estas se utilizan con el fin de minimizar el posible impacto de este, reduciendo el número de microalgas tóxicas o removiendo el organismo con su toxina del medio. Para esto existen diversos tipos de control los cuales se clasifican en dos grupos, los controles directos (físico, químico y biológico) implica que son utilizados directamente en contra de la especie FANs, mientras que el indirecto (medidas de evasión) son medidas para disminuir el posible impacto del evento al cultivo, evitando su contacto con la especie FANs.

#### Controles físicos

Los métodos físicos de control son aquellos que pueden remover o eliminar físicamente las células algales de la columna de agua o generar una barrera física para limitar el paso de las células algales. Entre estos sistemas se encuentran las arcillas, el UV, floculantes, sistemas de aireación, entre otros (**Tabla 2**). Los mecanismos de control de estos sistemas son la resuspensión de sedimentos, daño estructural celular, mezcla de la columna de agua, floculación, entre otros.

#### Controles químicos

Los métodos químicos de control son aquellos que utilizan reactivos que impactan en el crecimiento celular, inhiben la fotosíntesis o degradan estructuras celulares provocando lisis celular. Entre estos controles se encuentra el peróxido de hidrogeno, el cloro ( $Cl_2$ ), dióxido de cloro ( $ClO_2$ ), metabolitos secundarios provenientes de macroalgas, entre otros (**Tabla 2**). Hasta ahora, muchos de estos alguicidas se han descrito eficientes en

laboratorio, sin embargo, se han registrado pocos usos de estos en sistemas marinos abiertos (Rounsefell and Evans, 1958; Burson et al., 2014).

### Controles biológicos

Los métodos biológicos de control son aquellos que utilizan agentes biológicos para remover especies FANs o inhibir su crecimiento. Se han descrito diversos organismos como control biológico contra las microalgas, tales como, virus, bacterias, hongos, peces, IMTA (sigla en inglés acuicultura multitrofica integrada) (Tabla 2). Estas mitigaciones suelen ser especie-específicas (ej. Pastoreo; Alelopatía) y no generan contaminación secundaria, por lo que, se consideran como soluciones de bajo impacto ambiental.

### Medidas de evasión

A diferencia de los métodos directos de mitigación, las medidas de evasión no son con control activo de la abundancia o crecimiento de las especies FANs. Estas son medidas para minimizar el potencial impacto sobre los cultivos acuícolas, por lo que, se evade el contacto del cultivo con las microalgas (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Lista resumen de los sistemas de mitigación de especies FANs.

<b>Directos</b>	<b>Indirectos</b>
<b>Físicos</b>	<b>Medidas de evasión</b>
Arcillas Floculantes	Faldones perimetrales Inmersión de Jaulas
Polímeros sintéticos Centrifugación	Jaulas con redes profundas suspensión de la alimentación
UV	Traslado de jaulas/peces a zonas libres de FANs
Aireación Sonicación Temperatura	
<b>Químicos</b>	
Peróxido de hidrogeno Dióxido de Cloro	
Cloro Ozono	

Fitoquímicos (metabolitos secundarios de plantas)	
<b>Biológicos</b>	
Virus Bacterias Plancton IMTA	

#### 9.1.4 Fichas

Control Físico

#### **Arcillas**

Dentro de las medidas de mitigación utilizadas y probadas tanto en experiencias piloto, de laboratorio como durante un evento FAN real, resalta la alternativa que involucre emplear arcillas para combatir este proceso. Las arcillas, incluyendo a las arcillas modificadas, son el método más probado, del que existe más información y más alternativas de productos a la fecha. Actualmente las arcillas son utilizadas como una medida de mitigación in situ para procesos FAN en gran parte de Asia, siendo China el principal productor de arcillas modificadas. y toxinas desde la columna de agua hacia el fondo (**Figura 32**).



**Figura 32:** Foto de dispersión de arcillas para la supresión de una floración activa de fitoplancton ictiotóxico en Korea del Sur (fotografía de H. Kim en referencia N°. 97).

Por otro lado, para disminuir la cantidad total de arcilla a utilizar, se ha expandido el uso de arcillas modificadas, que tienen efectividades mucho más altas respecto de la floculación para con el fitoplancton, pudiendo aplicarse más diluidas que las arcillas naturales (Anderson, 2009). La principal modificación tiene relación con la polaridad de la partícula, haciendo que las arcillas modificadas tengan una atracción electroquímica más altas con las células de fitoplancton, haciéndolas flocular rápidamente. Este cambio físico en la arcilla modificada también genera una mayor eficiencia en la remoción de nutrientes.

**Ficha 1.** Ficha resumen del método de mitigación de arcillas.

<b>Funcionamiento</b> Físico
<b>Mecanismo de acción</b> -Floculación -Inhibición de la fotosíntesis (fotoinhibición) -Disminución tasas de crecimiento -Reducción de la actividad enzimática antioxidante -Inducción de la muerte celular
<b>Especies</b> - <i>Amphidinium carterae</i> - <i>Alexandrium tamarense</i> - <i>Aureococcus anophagefferens</i> - <i>Chatonella antiqua</i> - <i>Chattonella marina</i> - <i>Chlorella vulgaris</i> - <i>Cochlodinium polykrikoides</i> - <i>Cylindrotheca closterium</i> - <i>Gymnodinium breve</i> - <i>Gymnodinium sp.</i> - <i>Gyrodinium sp.</i> - <i>Heterocapsa circularisquama</i> - <i>Heterocapsa triquetra</i> - <i>Heterosigma akashiwo</i> - <i>Isochrysis galbana</i> - <i>Karenia brevis</i> - <i>Karenia mikimotoi</i> - <i>Mesodinium rubrum</i> - <i>Microcystis aeruginosa</i> - <i>Nitzschia closterium</i> - <i>Noctiluca scientillans</i> - <i>Phaeocystis globosa</i> - <i>Prorocentrum minimum</i> - <i>Prorocentrum micans</i> - <i>Prorocentrum donghaiense</i> - <i>Phaeocystis globosa</i> - <i>Phaeodactylum tricornutum</i> - <i>Pseudo-nitzschia pungens</i> - <i>Rhizosolenia fragilissima</i> - <i>Scrippsiella trochoidea</i> - <i>Skeletonema costatum</i> - <i>Thalassiosira sp.</i> - <i>Thalassiosira subtilis</i> - <i>Cianobacterias del tipo Microcystis sp.</i> - <i>Propágulos microscópicos de Ulva prolifera</i>
<b>Efectividad</b> -Efectividad especie-específica depende de la cantidad de arcilla aplicada, en general se han reportado efectividad de remoción de entre 80 – 95% utilizando concentraciones de 10g/L
<b>Condiciones de uso</b> Debe utilizarse solo en presencia de una floración activa. La dispersión de la arcilla se debe realizar mezclada con agua en embarcaciones con grandes tanques de acumulación de agua (para poder dosificar entre 100 a 400 g/m <sup>2</sup> ) y sistemas hidráulicos de bombeo para disparar el agua a altas presiones

<p><b>Ventajas</b></p> <p>Efectivo en eliminar células de la columna de agua Rápida tasa de sedimentación en el agua</p> <p>Bajo costo del material</p> <p>Condiciones de almacenamiento no específicas No tóxico ni reactivo con ninguna sustancia</p> <p><b>Desventajas</b></p> <p>No es especie específica</p> <p>Causa anomalías en comportamiento de peces Disminución de nutrientes</p> <p>Alto costo de aplicación</p> <p>No se puede aplicar de forma preventiva</p>
<p><b>Impacto ambiental</b></p> <p>No se descompone con el agua, se acumula en el fondo y se ha descrito que no tiene efectos ambientales en el agua. No es especie-específica, se ha descrito fuerte impacto en el zooplancton, pero poco impacto en macroinvertebrados y peces.</p> <p>Genera una disminución en las concentraciones de nutrientes en el agua.</p> <p>Puede generar acumulación de otros componentes, como las toxinas del fitoplancton en los fondos.</p>
<p>Referencias: 1, 10, 18, 19, 21, 30, 32, 33, 35, 37, 38, 40-50, 53, 58, 61-66, 69-72, 75, 80, 87, 89-96, 98, 100, 103</p>

**Otros métodos físicos: Floculantes, polímeros sintéticos, centrifugación, sonicación y temperatura.**

Si bien algunos métodos que implican la utilización de polímeros sintéticos y/o centrifugación han reportado ser efectivos y eficientes en la remoción de fitoplancton, sus limitaciones tecnológicas (centrifugación) y de toxicidad para con el medio ambiente (polímeros sintéticos) no permiten que estas metodologías se hayan probado a escala real o in situ durante el desarrollo de un evento FAN.

**Ficha 2.** Ficha resumen de otros métodos de mitigación físicos para floculación, polímeros sintéticos y centrifugación.

<p><b>Funcionamiento</b></p> <p><b>Físico</b></p> <p><b>Mecanismo de acción</b></p> <p>Floculación y polímeros sintéticos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-PSAS (Polisilicato-aluminio sulfato).</li> <li>-AS (Sulfato de aluminio).</li> <li>-PAC (Cloruro de polialuminio).</li> </ul> <p><b>Centrifugación:</b></p> <p>-Flujo del agua del estanque por medio de un separador que utiliza el movimiento centrífugo, generando la separación de todas las partículas en el agua, resultando un sobrenadante que contiene casi la totalidad del plancton contenido en el agua.</p>
<p><b>Especies</b></p> <p>Floculación y polímeros sintéticos</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-<i>Chattonella marina</i> -<i>Skeletonema costatum</i> – <i>Thalassiosira subtilis</i> – <i>Heterosigma akashiwo</i> – <i>Euglena</i> sp.</li> </ul> <p><b>Centrifugación</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-<i>Cochodinium polykrikoides</i>.</li> </ul>

**Efectividad:**

Floculación y polímeros sintéticos:

- Arenas, tierra y otros compuestos, de baja efectividad para compuestos no tratados (estandarizados en base a tamaño de partícula), a media efectividad con material tratado (arenas molidas).
- Polímeros sintéticos han demostrado alta efectividad en experiencias de laboratorio, alcanzando tasas de remoción celular de entre 20-90% y una reducción de la clorofila total de entre 75-93%.

Centrifugación:

- A pequeña escala, el método tiene una efectividad de remoción del 93% del total de células de fitoplancton.

**Condiciones de uso:**

Floculación y polímeros sintéticos:

- Aplicación en estanques cerrados y a modo experimental. No aplicable en condiciones reales.

**Centrifugación:**

- El agua debe pasar por un sistema de flujo continuo donde se encuentre en medio el dispositivo que separa las partículas por medio de la centrifugación.

**Ventajas:**

- Floculación y polímeros sintéticos:
- Efectivo en eliminar células de la columna de agua.

**Rápida tasa de sedimentación en el agua**

Condiciones de almacenamiento no específicas Centrifugación:

- Aplicable a pequeña escala para cultivos experimentales

**Rápida tasa de sedimentación en el agua**

Condiciones de almacenamiento no específicas Centrifugación:

- Aplicable a pequeña escala para cultivos experimentales

**Desventajas:**

- Floculación y polímeros sintéticos: No es especie específica
- Causa anomalías en comportamiento de peces No se descompone en el agua de mar
- Debe ser utilizado en tanques contenidos para evitar contaminación como efluentes.

**Centrifugación:**

- Alto costo del sistema y tratamiento del sobrenadante son un obstáculo para su aplicación.

**Impacto ambiental:**

Floculación y polímeros sintéticos:

Los polímeros sintéticos actualmente están prohibidos y no hay país que implemente un uso de estos, dado a la alta toxicidad de estos, especialmente con otros organismos acuáticos.

**Centrifugación:**

El sobrenadante debe ser recolectado, almacenado y enviar a un posterior tratamiento de desechos tóxicos, lo que tiene un alto costo económico e impacto ambiental.

Referencias: 97.

## **Sistemas de mitigación en base a aireación**

### **Aireación por surgencia**

Los sistemas de aireación corresponden a un sistema de mitigación de tipo físico. Esta tecnología, que permite entre otras cosas mezclar la superficie del agua, puede ser instalada en centros de cultivo de salmónidos y/o mitílidos creando condiciones que favorecen el rápido crecimiento de diatomeas no móviles en lugar de especies FANs que tienden a crecer en sistemas lénticos y altamente estratificados.

Cuando ocurre una floración de microalgas nocivas y/o tóxicas, comienza en bombeo de aire desde la profundidad y da como resultado una sobrevivencia significativamente mejor que en las jaulas no tratadas. No hay estudios científicos publicados o informes técnicos que detallen cómo este sistema puede ser efectivo, pero el hecho de que ha sido utilizado por grandes empresas piscicultoras en Canadá durante muchos años indica que debe tener cierto grado de eficacia. Es posible que las burbujas arrastren horizontalmente las células de *H. akashiwo* en la superficie mediante agua libre de células desde una mayor profundidad, evitando la exposición de los peces al alga. Las células de *Heterosigma* son altamente delicadas y es posible que la turbulencia haga que las células se rompan. Este método puede no ser efectivo con otras especies que son más robustas, que tienen toxinas más persistentes o que se concentran en altas densidades celulares en zonas subsuperficiales de la columna de agua (ej., 'capas finas' de *P. verruculosa*).

### **10.2.2 Cortinas de burbujas**

Similar a la aireación por surgencia, este método utiliza tubos porosos con un peso de plomo flexible para contrarrestar la flotabilidad. En lugar de estar debajo del centro de cada jaula, los tubos se colocan alrededor del perímetro inferior de cada jaula. Al menos una empresa salmonicultura ha usado esta tecnología en B. Columbia, Canadá donde se producen floraciones frecuentes de la rafidofícea *H. Akashiwo*.

Las cortinas de burbujas son ampliamente utilizadas en Chile. En la tabla 3, se detallan las especificaciones técnicas del funcionamiento de las cortinas de burbujas de 3 proveedores en Chile. Dos de las mayores empresas prestadoras de este servicio reportan alrededor de 800 proyectos actualmente en ejecución (data a marzo de 2021). A pesar de que esta tecnología es ampliamente utilizada, la búsqueda sistemática evidenció escasa información científica que respalde su uso en acuicultura, y mucho menos demostrando su eficiencia en el control de FANs. De hecho, la utilización de esta tecnología durante la masiva muerte de salmones en otoño de 2016 evidenció la baja efectividad de esta metodología para el control de la microalga ictiotóxica *P. verruculosa* (Mardones et al., 2020) (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Resumen especificaciones técnicas sobre cortinas de burbujas ofrecidas por proveedores chilenos.

Empresa	Equipos	Profundidad de instalación (m)	Perforaciones	Caudal	Tamaño burbuja: origen	Tamaño burbuja: salida	Gas	Presión de operación (bar)	Movimiento de agua
A	Difusor de oxígeno	8	6000/metro de manguera	1000 lpm aire	Microburbuja 50-250 um	No hay burbujas (Oxígeno se absorbe)	Oxígeno puro	1	-
	Difusor de surgencia	-	-	-	Microburbuja (cms)	-	-	-	1 m3/s
B	Anillo de surgencia	-	-	600 lpm	Desconocido	Desconocido	Aire	8 a 10	-
	Cortina perimetral	18	-	-	Desconocido	Desconocido	Aire	-	-
C	Cortinas de bloqueo	25-30	-	1,5 - 3 L/h	0,6 mm promedio	Se mantiene tamaño	Aire comprimido	3 a 4	-
	Discos de surgencia	-	-	-	-	-	-	-	-

**Ficha 2.** Ficha resumen de métodos de mitigación en base a aireación.

<p><b>Funcionamiento:</b></p> <p>Liberación de aire comprimido desde profundidad hacia la superficie.</p>
<p><b>Mecanismo de acción:</b></p> <p>Dilución de la masa de agua superficial (aireación por surgencias) / activación de barrera de ingreso de microalgas de forma horizontal (cortinas de burbujas).</p>
<p><b>Especies:</b></p> <p><i>Cochlodinium polykrikoides</i> (100), <i>Heterosigma akashiwo</i> (103), <i>Pseudochattonella verruculosa</i> (131)</p>
<p><b>Efectividad:</b></p> <p>La efectividad de este método aún no ha sido comprobada, por lo que no existe literatura publicada actualmente. Solo existen reportes informales que indican una mejora en la condición de los peces en solo algunos casos puntuales (ej., blooms de <i>H. akashiwo</i> en British Columbia, Canadá)</p>
<p><b>Condiciones de uso:</b></p> <p>Es necesario que exista la suficiente profundidad en el sitio para asegurar agua libre de microalgas.</p> <p>A asegurar que la capa profunda no esté con: una importante baja de OD, rica en nutrientes o rica en ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) debido a la acumulación de material orgánico desde la producción acuícola.</p>

**Ventajas:**

Reduce la estratificación vertical el cual es el escenario ideal para el crecimiento de las especies FANs que afectan el cultivo de peces; incrementa los niveles de OD cuando estos disminuyen debido al metabolismo bacteriano.

**Desventajas:**

Si las aguas profundas poseen bajos niveles de OD, esto podría generar una disminución de OD en la capa superficial de la columna de agua al producirse la mezcla.

Si la capa profunda cercana al fondo marino es rica en H<sub>2</sub>S, esto podría 'envenenar' la capa superficial donde se realiza el cultivo de peces.

Si la capa profunda es rica en nutrientes (N, P) esto podría estimular aún más el crecimiento de las especies FANs que están afectando la capa superficial de la columna de agua.

**Impacto ambiental:**

Nulo impacto ambiental si los sistemas mecánicos están operando correctamente evitando la liberación de combustibles y/o aceites.

Referencia: 100, 103 y 131

**10.3 La radiación UV**

La radiación UV o luz UV (200-280 nm) es una promisoriosa aproximación para prevenir las FANs a través de la supresión del crecimiento. Esto se debe a que la luz UV puede afectar a las especies FANs a distintos niveles celulares que van desde la generación de mutaciones a nivel genético hasta la degradación de membrana plasmática de la célula. Esta es una técnica ampliamente usada en la desafección y esterilización de agua tanto marina como dulce. Puede matar virus, bacterias, hongos, fitoplancton etc. Adicionalmente,

esta es una técnica que puede ser instalada en distintos lugares como en plantas de procesos y wellboats. Sin embargo, el uso de esta técnica para la mitigación y prevención de FANs debe ser evaluada para cada especie y considerando las condiciones de uso en condiciones naturales. Esto se debe a que distintas especies pueden ser eliminadas con uso de diferentes dosis de UV.

**Ficha 3.** Ficha resumen de mitigación por radiación ultravioleta (UV).

<p><b>Funcionamiento:</b> Efecto de luz ultravioleta (UV)</p>
<p><b>Mecanismo de acción: Daño del ácido nucleico.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Afecta la captación de la luz, transferencia de electrones y transporte. Afecta la asimilación y fijación de nitrógeno.</li> <li>- Afecta la síntesis de toxinas.</li> <li>- Afecta la capacidad antioxidativa e integridad de la membrana celular. Afecta la gravedad específica y velocidad de sedimentación.</li> </ul>
<p><b>Especies: Muestras de campo</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Fitoplancton (23).</b></li> <li>- <i>Isochrysis galbana</i> - <i>Pyrocystis lúnula</i>, <i>Prorocentrum micans</i> (23), <i>Amphora coffeaeformis</i> - <i>Tetraselmis suecica</i></li> </ul> <p><b>Aguas lastre (74).</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Scripsiella trochoidea</i> - <i>Alexandrium catenella</i>.</li> </ul>
<p><b>Efectividad:</b></p> <p>(23) La concentración de las muestras de campo no varió significativamente comparada con el control (dosis: 200 y 500 mWs cm<sup>-2</sup>). No obstante, el fitoplancton no fue capaz de volver a crecer particularmente cuando las muestras fueron tratadas con 500 mWs cm<sup>-2</sup>.</p> <p>(23, 36) El efecto de luz UV depende de la especie.</p>

(56, 57) Bajas dosis de 100 y 200 mJ/cm<sup>2</sup> no causaron la inmediata inactivación de células. No obstante, dosis  $\geq$  400mJ/cm<sup>2</sup> las inactivan permanentemente.

(74) El uso de reactores de UV de baja presión (254 nm), en combinación con filtros, mostró un patrón de disminución de fitoplancton, seguido de un incremento del crecimiento.

(104) dosis entre 9 y 122 mJ/cm<sup>2</sup> suprimen de manera parcial el crecimiento. Dosis de 160 y 172 afectan severamente el crecimiento de *A. catenella* (Ac).

(109). Luego de 10 segundos de irradiación el UV (7,72 mW cm<sup>-2</sup>) aparentemente inactivo las células, pero una subsecuente foto-reactivación de las células fue observada. No obstante, se encontró que la combinación de métodos UV/O<sub>3</sub> y UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibe la foto-reactivación.

**Condiciones de uso:**

En sistemas cerrados, debe ser empleado en flujos controlados para alcanzar la dosis

**Ventajas:**

Se ha evaluado el efecto del UV en varias microalgas las que muestran una positiva correlación entre incremento de la dosis y la supresión del crecimiento. Los efectos del UV son en varios niveles del organismo, que incluyen desde la disminución de la integridad celular hasta los ácidos nucleicos. Los avances tecnológicos hacen prever que esta tecnología será mejorada.

**Desventajas:**

El efecto de la luz UV (supresión del crecimiento de microalgas) puede ser afectado por variables ambientales (salinidad, pH), por lo que éstas deben ser consideradas al momento de evaluarlas y aplicarlas. A pesar de que a bajas dosis de UV se genera una supresión del crecimiento, luego de un tiempo las células pueden comenzar a dividirse.

**Impacto ambiental:**

Bajo impacto ambiental si su uso es localizado. Hay que considerar que puede afectar a especies no objetivo como larvas.

Referencia: 23, 36, 56, 57, 74, 104 y 109.

**Control Químico:****Peróxido de hidrógeno**

El químico peróxido de hidrógeno es un fuerte oxidador, el cual ha sido utilizado como mitigación química frente a las microalgas, pues puede generar daño y degradación en sus estructuras celulares, inhibir la fotosíntesis de estas e induce muerte celular. Además, este reactivo tiene una corta vida útil en medio acuático, por lo que, en poco tiempo pierde sus propiedades nocivas.

Este químico ha mostrado tener un gran potencial para controlar las FANs y de degradar sus toxinas, en los cuales se ha descrito que es efectivo en clases como Cyanophyceae, Dinophyceae, Bacillariophyceae, entre otros. Tanto en experimentos en laboratorio como in situ, a bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno es posible remover especies FANs. Sin embargo, esta técnica química genera un aumento de nutrientes de la columna de agua, lo que puede generar crecimiento exacerbados de otros organismos, además que es tóxico para organismos no objetivo de mitigar como otras especies de fitoplancton, zooplancton y/o macrofauna.

Esta técnica suele ser utilizada en sistemas cerrados, por ejemplo, agua de lastre de embarcaciones, pero también ha sido utilizada en sistemas abiertos, por ejemplo, en el estuario de Ouwerkerkse en Holanda frente a una floración de *Alexandrium ostenfeldii* el 2012 (Burson et al., 2014).

**Ficha 4.** Ficha resumen de mitigación por peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

<b>Funcionamiento:</b> Químico
<b>Mecanismo de acción:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>- Daño en estructuras celulares.</li><li>- Inhibición de la fotosíntesis.</li><li>- Inducción de la muerte celular.</li></ul>
<b>Especies:</b> <i>Microcystis aeruginosa</i> (112) - <i>Alexandrium ostenfeldii</i> (113) - <i>Polykrikos schwartzi</i> 97, Quistes de <i>Alexandrium catenella</i> (97, 114) y <i>Scripsiella trochoidea</i> (109).
<b>Efectividad:</b> En la concentración de 1.7x10 <sup>9</sup> céls/L <i>Microcystis aeruginosa</i> se observa que en dosis de 60 µM a 300 µM a las 2h existe una disminución significativa de la actividad del fotosistema II. Desde las 8h en concentraciones de 300 µM no se observa actividad del fotosistema II.  Se observo in situ que disminuyo el 99.8% de células vegetativas como quistes de la floración de <i>Alexandrium ostenfeldii</i> a concentración de 50 mg/L en 48h (97). Eliminación de <i>Polykrikos schwartzi</i> a concentración de 100 ppm en 24h (97). Eliminación de quistes <i>Alexandrium catenella</i> a concentración de 50 ppm en 48h (109).  Inactivación del 87.2% en <i>Scripsiella trochoidea</i> a una concentración de 100 mgL <sup>-1</sup> en 5 min. (104). <i>A. catenella</i> fue completamente destruida en concentraciones de 200 ppm en 30 min.

<p><b>Condiciones de uso:</b></p> <p>Potencialmente disponible para utilizar en sistema cerrado.</p> <p>No se encontraron condiciones de uso para aplicaciones <i>in situ</i>.</p>
<p><b>Ventajas:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Efectivo en eliminar células y quistes Degradable rápidamente en el agua Bajo costo del reactivo.</li> </ul> <p><b>Desventajas:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- No es especie específica.</li> <li>- No es suficiente para mitigar en aguas de lastres, se debe mezclar con otra mitigación para que sea realmente efectivo.</li> <li>- Causa anomalías en comportamiento de peces.</li> <li>- Mortalidad en zooplancton, invertebrados y en algunos peces Aumento de los nutrientes.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inflamable.</li> <li>-Alto costo de aplicación.</li> </ul>
<p><b>Impacto ambiental:</b></p> <p>Se descompone rápidamente en el agua y se ha descrito que no tiene efectos ambientales en el agua.</p> <p>No es especie-especifica, se ha descrito fuerte impacto en el zooplancton, pero poco impacto en macroinvertebrados y peces.</p> <p>Genera un aumento en las concentraciones de nutrientes en el agua.</p>
<p>Referencia: 97,104, 109,112, 113</p>

## Dióxido de cloro y cloro

El dióxido de cloro y el cloro son desinfectantes comúnmente utilizados para esterilizar aguas en Europa y EEUU. Estos biocidas de fuerte oxidación afectan el crecimiento de diferentes organismos como, Cyanophyceae, Dinophyceae, Bacillariophyceae, entre otros. De estos, el dióxido de cloro tiene una mayor capacidad de oxidación que el cloro, lo que

lo hace más eficiente en remover microalgas, además de ser menos tóxico para especies no objetivo, ya que, no reacciona con el agua generando moléculas THM (trihalometanos).

Estos químicos pueden generar una reducción de la actividad primaria (ej. disminución de la fotosíntesis y de la autofluorecencia de la clorofila a), reduce la actividad enzimática de esterasa, lo que lo hace una potencial alternativa para controlar especies FANs. Estos son utilizados en sistemas cerrados, tales como centrales eléctricas. Sin embargo, a la actualidad no ha sido utilizado en sistemas abiertos y pocos de los estudios con estos químicos evalúan el impacto sobre los organismos marinos no objetivo.

**Ficha 5.** Ficha resumen de mitigación por dióxido de cloro y cloro.

<p><b>Funcionamiento:</b> Químico</p>
<p><b>Mecanismo de acción:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Reducción de la actividad primaria y la autofluorecencia de clorofila a</li> <li>- Reducción de actividad esterasa</li> <li>- Degradación de la membrana resultando en lisis celular</li> </ul>
<p>Especies: <i>Alexandrium catenella</i> (104) - <i>Phaeocystis globosa</i> (122) - <i>Tetraselmis marina</i> (23) - <i>Isochrysis galbana</i> (23) - <i>Prorocentrum micans</i> (23) - <i>Pyrocystis lúnula</i> (23), <i>Cocconeis scutellum</i> (123, 124) - <i>Chlorella salina</i> (125) - <i>Chaetoceros lorenzianus</i> (17) - <i>Chaetoceros wighami</i> (124) - <i>Amphiprora palludosa</i> (124) y <i>Amphora coffeaeformis</i> (124, 23).</p>

**Efectividad:**

17. Todas las concentraciones generan algún efecto en la viabilidad de *Chaetoceros lorenzianus*, tanto de cloro como el dióxido de cloro a concentraciones 0.05-2 mg/L y desde la concentración 1 mg/L disminuye la viabilidad a menos del 50% a los 30 min. Se observa un efecto toxico a los 0.2 mg/L ClO<sub>2</sub> y 0.5 mg/L. Se recomienda una concentración de 0.2mg/L para disminuir el impacto a especies no objetivo.

122.\* El dióxido de cloro en concentraciones mayores de  $2.96 \times 10^{-2}$  mmol/L es eficaz en eliminar a la especie *Phaeocystis globosa* en densidades celulares de  $2.35 \times 10^9$  células/mL a las 96 h.

Las células de *Cocconeis scutellum* disminuyen su metabolismo celular desde una concentración de clorina de 1.0 mg/L. Desde los 5 a 60 min de exposición donde hay una mayor disminución de su metabolismo a los 60 min.

El efecto toxico de Cloro en las especies *Chaetoceros wighami*, *Amphiprora palludosa*, *Amphora coffeaeformis* y *Cocconeis scutellum* es mayor a bajas densidades celulares del organismo. En dosis de 3 mg/L de cloro reduce de 80- 91% la producción primaria posterior a 48 h.

Las células de *Chlorella salina* disminuyen su metabolismo celular desde una concentración de cloro de 1.0 mg/L. Desde los 5 a 60 min de exposición donde hay una mayor disminución de su metabolismo a los 60 min.

23. En el cultivo de mezcla de las 5 especies (*Tetraselmis marina*, *Isochrysis galbana*, *Prorocentrum micans*, *Pyrocystis lunula* y *Amphora coffeaeformis*), se observó efecto que en las dosis de 5 y 10 ppm hay una disminución significativa de la eficiencia fotoquímica del cultivo y una disminución de la concentración de ATP.

104. En concentraciones de 20, 30, 50 y 75 ppm a los 2.5 y 5 min hay un efecto significativo en la disminución de la viabilidad celular (tasa de crecimiento negativa) en la especie *Alexandrium catenella*.

**Condiciones de uso:**

Potencialmente disponible para utilizar en sistema cerrado.

No se encontraron condiciones de uso para aplicaciones in situ No existen actualmente condiciones de uso para estas mitigaciones para aplicaciones in situ.

**Ventajas:** Bajo costo Degradable

**Desventajas:** Mortalidad de organismos de no interés, bacterias, fitoplancton y zooplancton. En Chile su uso a nivel de laboratorio y en terreno no ha sido evaluado hasta el momento

Impacto ambiental: Los impactos al ecosistema son desconocidos
Referencia: 17,23,104, 122,123, 124,125.

### **Otros químicos: Fitoquímicos y Ozono.**

Algunos bioquímicos extraídos desde plantas pueden afectar el crecimiento de especies que generan FANs. Estas moléculas se conocen como fitoquímicos y son parte del metabolismo secundario. Los fotoquímicos se extraen de plantas que muchas veces son consideradas plagas y/o invasivas y que tienen un alto capacidad competitiva para excluir a plantas nativas o endémicas. Esta alta capacidad competitiva está relacionada con las potentes sustancias alelopáticas que pueden generar. En la literatura existen varios trabajos en laboratorio que muestran la capacidad de los extractos de estas plantas de actuar como biocidas no obstante su uso a escala piloto o real ha sido pobremente evaluado.

Por su parte, el ozono también ha sido probado para la eliminación de algunas especies que generan FANs a nivel de laboratorio. Se ha observado que el agua de mar ozonizada puede ser efectiva para inactivar toxinas asociadas a dinoflagelados, así como reducir los niveles de estas en mariscos. Cuando el ozono entra en contacto con los constituyentes del agua de mar, reacciona con los bromuros para formar ácido hipobromoso e ion hipobromito. Una mayor ozonización puede resultar en la formación de bromoformo y en presencia de una fuente de nitrógeno, se puede formar bromaminas las que influyen la oxidación de toxinas. No obstante, algunos de estos productos que se forman pueden ser potencialmente cancerígenos para humanos ( $\text{BrO}_3$ ). Adicionalmente como el ozono es una molécula inestable en el agua, puede generar radicales hidroxilos ( $\text{OH}^-$ ) que afectan la membrana de las células.

**Ficha 6.** Ficha resumen de mitigación por fitoquímicos y ozono (O<sub>3</sub>).

<b>Funcionamiento:</b> Otros químicos: Fitoquímicos y Ozono.
<b>Mecanismo de acción:</b> Fitoquímico -Inhibición de la fotosíntesis. -Afecta la integridad celular Ozono -Afecta la integridad celular. -Oxida toxinas. -Daño oxidativo de la célula. -La formación de ácido hipobromoso contribuye a la inactivación celular.
<b>Especies:</b> Fitoquímico: <i>Heterosigma akashiwo</i> , <i>Chattonella marina</i> , <i>Alexandrium tamarense</i> , <i>Phaeocystis globosa</i> .  Ozono: <i>Karenia brevis</i> , <i>Cochlodinium polykrikoides</i> .
<b>Efectividad:</b> Fitoquímico - El crecimiento de las especies FANs fue inhibido por la adición de extractos de <i>Spartina alterniflora</i> (planta terrestre invasiva). Aunque la magnitud del efecto fue especie dependiente. - Flavonoides, lo que pueden ser extraídos desde plantas, inhiben significativamente el crecimiento.  Ozono - La exposición de <i>K. brevis</i> por 10 minutos a 135 mg de ozono puede reducir la concentración de toxinas. No obstante, esta es una dosis muy alta para ser manejada en ambiente natural. - Reduce la viabilidad celular rápidamente y la densidad. No obstante, la temperatura y el PH del agua pueden disminuir la eficacia del ozono.
<b>Condiciones de uso:</b> Fitoquímicos: No existen condiciones de uso ya que hasta el momento se han evaluado en laboratorio. Ozono No existen condiciones de uso ya que hasta el momento se han evaluado en laboratorio.
<b>Ventajas:</b> Fitoquímico Son considerados como una promisorio técnica biocida debido a que potencialmente son ecológicamente seguros. <b>Desventajas</b> Fitoquímico: Solo se ha probado a nivel de laboratorio. Ozono: -La formación de BrO <sub>3</sub> como un subproducto cancerígeno es preocupante para la ozonización del agua de mar. El uso de ozono menos de 1mg/L produce cantidades despreciables de BrO <sub>3</sub> . Sin embargo, el incremento de la dosis de ozono conduce a un incremento exponencial del BrO <sub>3</sub> .
<b>Impacto ambiental:</b> Fitoquímico: No ha sido evaluado a nivel real, pero podría ser bajo. Ozono: En altas concentraciones puede generar moléculas potencialmente cancerígenas.
<b>Referencia:</b> 86, 134, 140, 141

## **Control biológico:**

### **IMTA (Siglas en inglés de *-Integrated Multitrophic Aquaculture*)**

Los desechos del cultivo intensivo provenientes de la acuicultura de peces y/o mariscos como excreciones pueden aportar una gran cantidad de nutrientes que potencialmente pueden promover la generación de FANs. No obstante, la adición de cultivos como los de macroalgas puede ser beneficiosos no solo para el ambiente sino también para mitigar o prevenir FANs. Este tipo de sistemas que considera el cultivo de peces/mariscos junto a macroalgas se conoce como IMTA por su acrónimo en inglés “Integrated multitrophic aquaculture”. El beneficio que pueden generar las macroalgas en este sistema es que son capaces de remover los nutrientes desde el ambiente los que utiliza para crecer.

La remoción de nutrientes desde el ambiente es importante para que estos no queden disponibles para las especies que generan FANs, disminuyendo así la posibilidad de generar eventos nocivos. Adicionalmente, existen estudios que demuestran que las macroalgas pueden generar efectos alelopáticos los que inhiben el crecimiento de las especies FANs o generan su muerte. A medida que las macroalgas crecen en un sistema IMTA podrían ir generando un aumento de PH, condiciones en que el crecimiento del fitoplancton se ve inhibido. Si bien existen trabajos que demuestran que el IMTA puede tener varios efectos positivos en el ambiente, estos han sido realizados a nivel de laboratorio y piloto, y hay muy pocas experiencias a nivel real.

**Ficha 7.** Ficha resumen de mitigación por medio de la aproximación IMTA.

<b>Funcionamiento:</b>
------------------------

Sistemas de cultivo multitróficos integrados.
---

**Mecanismo de acción:**

- Efectos alelopático.
- Competencia por nutrientes entre macroalgas y microalgas.
- Incremento del PH (>9) inhibe crecimiento de fitoplancton.
- Posibles efectos de bacterias asociadas a macroalgas

**Especies:**

*Alexandrium catenella* 114, *Heterosigma akashiwo* 115, *Alexandrium tamarense* 115, *Prorocentrum micans* 116, *Heterosigma akashiwo* 117, *Skeletonema costatum* 117, *Tetraselmis subcordiformis* 117, *Nitzschia closterium* 117, *Chaetoceros gracile* 117, *Chroomonas placoidea* 117, *Isochrysis galbana* 117, *Alexandrium tamarense* 117, *Heterosigma akashiwo* 118, *Alexandrium tamarense* 118, *Skeletonema costatum* 118, *Aureococcus anophagefferens* 119, *Chattonella marina* 119, *Cochlodinium polykrikoides* 119, *Karlodinium veneficum* 119, *Karenia brevis* 119, *Prorocentrum mínimum* 119, *Pseudo-Nitzschia multiseriis* 119, *Prorocentrum donghaiense* 120, *Prorocentrum donghaiense* 121, *Alexandrium tamarense* 121, *Amphidinium carterae* 121, *Scrippsiella trocoide* 121.

## Efectividad

*A. catenella* expuesta a concentraciones ambientales reales de macroalgas como *Saccharina latissima* y *Ulva sp*, con excepción de bajos niveles de *Chondrus crispus*, causaron lisis celular y reducción significativa de las densidades (17-74% en 2-3 días y 42-96% en un mes). *S. latissima* disminuyó significativamente la acumulación de STX en *Mytilus edulis* llegando a valores bajo el límite de cierre de 80 mg STX 100g<sup>-1</sup>.

El crecimiento de *H. akashiwo* y *A. tamarense* expuesta a tejido vivo y seco pulverizado de *Ulva pertusa* fue inhibido. El filtrado del cultivo de *U. pertusa* aparentemente no inhibió el crecimiento de las microalgas nocivas.

El crecimiento de *Prorocentrum micans* fue inhibido por la adición de tejido fresco y seco pulverizado de *Ulva pertusa* y *Ulva linza*. Extractos acuosos y con metanol de ambas algas tienen un fuerte efecto inhibitorio del crecimiento. Por el contrario, extractos con acetona, éter y cloroformo no tienen un efecto aparente.

El crecimiento de ocho microalgas (nocivas y no nocivas) cultivadas junto a *Ulva pertusa* fueron inhibidas por sustancias alelopáticas. Existió variación entre las microalgas en los niveles de inhibición.

El crecimiento de *Heterosigma akashiwo*, *Alexandrium tamarense*, *Skeletonema costatum* fue inhibido significativamente por la adición de tejido fresco de *Ulva lactuca*. No obstante, existió variación entre las especies en los niveles de inhibición. Además, los resultados sugieren que los compuestos alelopáticos son rápidamente degradables y una inhibición del crecimiento a largo plazo necesita la adición continua de los compuestos originados de la macroalga.

El tejido fresco de *Ulva lactuca* adicionada en niveles ambientalmente reales (mg/L) fue capaz de lisar e inhibir fuertemente el crecimiento de 7 especies FAN, de forma dosis dependiente. Durante los experimentos, se mantuvieron los niveles de nutrientes, bajos niveles de bacteria y un pH similar entre los tratamientos. El dramático efecto alelopático de *U. lactuca* seca y pulverizada, con y sin tratamientos de post extracción, en las especies FAN demuestra que tiene aleloquímicos estables al calor que pueden jugar un mayor rol en los efectos alelopáticos observados. 121. El tejido fresco de *Ulva pertusa* o *Gracilaria lemaneiformis* inhibió significativamente el crecimiento de cuatro microalgas que producen FAN, o causaron mortalidad al final del experimento. Sin embargo, los efectos de los filtrados macroalgales en el crecimiento de las microalgas fue especie-específico.

El crecimiento de *P. donghaiense* fue afectado por el tejido fresco y seco pulverizado de las macroalgas: *Ulva linza*, *Corallina pilulifera* y *Sargassum thunbergii*.

## Condiciones de uso

Cultivo de macroalgas asociado al cultivo de peces y/o mariscos.

<p><b>Ventajas</b></p> <p>La integración de macroalgas con centros de acuicultura se debe considerar como una medida de mitigación no invasiva, ambientalmente amigable y potencialmente rentable para mitigar especies que producen FAN. Estas especies causan daño a la industria de acuicultura de mariscos y peces.</p>
<p><b>Desventajas</b></p> <p>En Chile su uso a nivel de laboratorio, piloto y real no ha sido evaluado hasta el momento.</p>
<p><b>Impacto ambiental</b></p> <p>Bajo impacto ambiental.</p>
<p><b>Referencia:</b> 114-121.</p>

### Otros biológicos:

Existen diversos organismos que juegan un rol importante en la regulación de la biomasa de fitoplancton en ambientes acuáticos, por lo que, en los últimos años ha tomado gran interés utilizar organismos como virus, bacterias, fitoplancton, zooplancton, hongos, entre otros, como sistema biológico de mitigación frente a FANs.

Se ha considerado que los controles biológicos de FANs son una opción económica y amigable con el medio ambiente, ya que, no generan contaminación secundaria y la interacción es especie específica. Estos organismos tienen diferentes mecanismos de acción que permiten la remoción y/o disminución de la microalga objetivo, tales como, secreción de metabolitos que inhiben la fotosíntesis, actividad enzimática o que inducen muerte celular; “pastoreo” y/o biofloculación.

Sin embargo, la utilización de sistemas de mitigación biológicas implica una serie de problemáticas como la competencia del organismo mitigante con otros depredadores ambientales, la sobrevivencia en el depredador en el ambiente, el aumento poblacional descontrolado del organismo mitigante, liberación de toxinas debido al sistema de mitigación, entre otros.

Hasta ahora la extrapolación de los experimentos realizados en terreno no ha tenido el éxito de lo reportado en los experimentos de laboratorio. Además, que pocos de los reportes de los controles biológicos estudian el posible impacto ambiental a mediano y largo plazo de la mitigación.

**Ficha 8.** Ficha resumen de mitigación por otros medios biológicos.

<b>Funcionamiento:</b> Biológico
<p><b>Mecanismo de acción</b></p> <p>Bacterias:</p> <p>Secreción de metabolitos secundarios que inhiben la fotosíntesis y actividad enzimática</p> <p>Biofloculación</p> <p>Lisis celular Virus/fagos:</p> <p>Lisis celular especie-especie Zooplancton:</p> <p>“Pastoreo”</p> <p>Fungís</p> <p>Ataque directo a la microalga</p>
<p><b>Especies</b></p> <p><i>Microcystis aeruginosa</i> (128,130,132), <i>Phaeocystis globosa</i>, <i>A. catenella</i> (126), <i>Synechococcus</i>, <i>Microcystis flosaquae</i> (132), <i>Alexandrium tamarense</i> (127), <i>Heterosigma Akashiwo</i> (127), <i>Prorocentrum dentatum</i> (127) y <i>Lyngbya majuscula</i> (128).</p>

**Efectividad:****Bacterias**

-*Brachybacterium* sp. YS-3 es efectivo en remover *A. catenella* (Ac), produce un metabolito secundario (1-acetyl- $\beta$ - carboline) el cual en 9 h muere el 90% del cultivo de microalga.

- *Pseudomonas fluorescens* inhibe el crecimiento celular y lisis de las células de *H. Akashiwo*. Además, la actividad algalítica de esta bacteria frente a las especies *A. tamarensis*, *Cochlodinium polykrikoides* y *Prorocentrum dentatum* fue de 71%, 68, y 44% respectivamente.

- La bacteria *Halobacillus* sp., mostró una alta tasa de floculación de la especie *M. aeruginosa*, a una concentración de 5 % de la bacteria. Esta removió densidades mayores a  $5 \times 10^7$  céls/mL en 2h. Además, que posterior a la biofloculación no se detectó microcistina.

**Virus:**

*Cyanofago* genera un rápido decaimiento del crecimiento y la fotosíntesis de *L. majuscula*.

**Zooplancton:**

Copépodo *Eudiaptomus gracilis* se alimenta de *M. aeruginosa*, controlando el crecimiento de esta.

**Fungí**

132. El co-cultivo de especies *Microcystis flosaquae*, *Microcystis aeruginosa* con la cepa fúngica *Trichaptum abietinum*, genera muerte celular de las especies de microalgas debidas al patógeno.

**Condiciones de uso**

No existen actualmente condiciones de uso para estas mitigaciones.

<p><b>Ventajas eco- friendly</b></p> <p>Libre de contaminación Altamente eficiente y específico Desventajas.  No se pueden utilizar en ambiente con baja concentración de oxígeno Crecimiento descontrolado de la especie utilizada para la mitigación.</p>
<p><b>Impacto ambiental</b></p> <p>No existen estudios en terreno del impacto de estas técnicas. Se sugiere que es amigable con el medio ambiente, pero existe la posibilidad de un crecimiento descontrolado del organismo mitigador.</p>
<p>Referencia:</p> <p>126, 127, 128, 129, 130,132</p>

### **Medidas de Evasión**

Las medidas de evasión de FANs son técnicas logísticas utilizadas por los salmonicultores para evitar mortalidades masivas de peces sin atacar directamente a las microalgas ictiotóxicas, por esto son conocidas también como ‘medidas de mitigación indirectas’.

### **Faldones perimetrales**

En el pasado, los sistemas de aireación por surgencia han sido utilizados complementariamente con faldones perimetrales confeccionados con telas o lonas de una determinada abertura de malla. Estos faldones están suspendidos verticalmente desde la superficie alrededor de las balsas jaulas. Estos se han utilizado principalmente en algunos lugares de Noruega y en British Columbia, Canadá. Una de las principales ventajas de esta técnica es que es menos probable que el agua que ha sido llevada a la superficie por bombeo de surgencia sea contaminada con agua con una alta abundancia de microalgas tóxicas circundando la balsa jaula. Los faldones perimetrales han funcionado bien con floraciones de *H. akashiwo* en el mar de Salish en la costa Oeste de Estados Unidos ya que esta especie a menudo se concentra en la capa superficial de la columna de agua. Estos faldones han sido menos eficientes con floraciones del dinoflagelado *Cochlodinium*

*sp.*, ya que esta especie tiene una migración vertical más profunda (hasta 25 m), sin embargo, una estrategia de levantar las lonas por las noches para eliminar células residuales para luego bajar las lonas cuando la densidad celular incrementa durante las últimas horas de la mañana ha resultado ser útil (Whyte et al., 2001).

Los faldones perimetrales pueden requerir un gran esfuerzo de instalación, despliegue cuando sea necesario y limpieza, y pueden producir una fuerte resistencia hidrodinámica lo que significa una tensión para las jaulas y redes, especialmente en zonas de alta dinámica de corrientes. Los faldones perimetrales se enrollan a lo largo de las jaulas y pueden retener agua salada volviéndose bio-incrustantes y pueden interferir con las prácticas normales de manejo. En otros casos, estos faldones son utilizados para efectuar tratamientos para la salud de los peces, como, por ejemplo, baños con agua dulce para tratar enfermedades relacionadas con amebas que afectan las branquias de los peces, por lo tanto, pueden tener doble propósito.

### **Inmersión de Jaulas**

En los primeros años de la piscicultura, generalmente no se recomendaba sumergir las jaulas con peces para evitar las FANs porque era técnicamente difícil con los diseños existentes que no estaban equipados para lidiar con tensiones estructurales y problemas de contención de peces. Además, los peces fisóstomos, como los salmónidos, deben ocasionalmente tomar aire para que sus vejigas flotantes se mantengan neutrales a flote, lo que no sería posible durante una inmersión continua. Los peces fisoclistos que carecen de conexión entre la vejiga gaseosa y el tracto gastrointestinal generalmente no tienen esta complicación, excepto cuando son juveniles. Al momento, solo se han desarrollado y confeccionado jaulas a gran escala para inmersión en entornos oceánicos (ej., jaulas SeaStation, AquaPod y OCAT diseñadas por InnovaSea Systems, Inc.) (**Figura 33**).



**A) Sea Station™**



**B) AquaPod™**



**C) OCAT**

Sistema de jaulas para cultivo de peces en océano abierto. A) modelo Sea Station, B) AquaPod y C) OCAT diseñadas por la compañía InnovaSea system.

### **Jaulas con redes profundas**

Algunas empresas que tienen estructuras de jaulas superficiales normales las han equipado con redes más profundas como un medio para aumentar la biomasa de cultivo, reducir la densidad de población y para evitar problemas con FANs. Esto se practicaba en el pasado en British Columbia, Canadá con el salmón Chinook, pero la mayor parte de la producción ahora se realiza con salmón del Atlántico (Nash, 2001). No hay evidencia de que los peces en cultivo busquen refugio deliberadamente en aguas más profundas durante una FAN. Generalmente, peces en cultivo que sufren estrés o problemas

ambientales, incluidos las FANs, a menudo se orientan en la superficie del agua. Estos peces permanecen en la superficie a pesar de tener acceso a aguas más profundas.

### **Suspensión de la alimentación**

La alimentación de los peces debe suspenderse si no se dispone de otro método de mitigación razonablemente eficaz. La demanda de oxígeno de los peces aumenta después de la alimentación y la ventilación de los peces podría ser difícil si las branquias se dañan por la exposición a microalgas ictiotóxicas y/o nocivas, ya que el daño branquial es común durante muchos de estos eventos de FANs (Mardones et al., 2015). Durante periodos prolongados de varias semanas, la suspensión de la alimentación provoca un mayor estrés fisiológico, incluida la reducción del glucógeno hepático, el catabolismo de los tejidos con pérdida de peso asociada y una mayor susceptibilidad a enfermedades crónicas como la enfermedad renal bacteriana, todo lo cual puede poner en peligro la supervivencia de los peces. Los peces que no se alimentan durante los eventos de FANs, suelen estar orientados hacia la superficie del agua cuando los humanos están presentes, ya que pueden estar condicionados a esperar alimento cuando los humanos caminan por una jaula individual, si la alimentación no se controla automáticamente. Por lo tanto, los trabajadores deben mantenerse alejados de los peces tanto como sea posible durante las floraciones algales nocivas para evitar que los peces reaccionen a la actividad humana. En resumen, la retención del alimento no es un método muy satisfactorio y no garantiza la supervivencia de los peces, pero se recomienda para eventos de corto plazo.

### **Traslado de jaulas/peces a zonas libres de FANs**

Remolcar las jaulas o trasladar los peces desde un área afectada por una FAN hasta un área de refugio conocida puede ser una medida de mitigación efectiva y es un método preferido en algunas regiones (Anderson et al., 2001; Rensel y Whyte, 2003). Sin embargo, presenta un riesgo y un gasto considerable, aunque una compañía de seguros puede compensar parte del gasto. El remolque implica los riesgos de daños estructurales

a las instalaciones, escapes de peces y mortalidad de peces por apiñamiento y estrés cuando las partes inferiores de las jaulas colapsan con las corrientes si no se remolcan correctamente. Para ser utilizado de manera efectiva, se debe diseñar un plan de contingencia de remolque con anticipación que incluya protocolos para abordar los sistemas de anclaje, el momento del movimiento con respecto de las mareas y la aprobación de las agencias gubernamentales si es necesario. El remolque de jaulas ha sido utilizado para prevenir mortalidades masivas de peces debido a floraciones de *H. akashiwo* en Puget Sound, estado de Washington y British Columbia (Horner et al., 1997; Whyte, 1997), así como el dinoflagelado tóxico *Karenia mikimotoi* (como *Gymnodinium aureolum*) en Noruega, y *Chattonella antiqua* en el mar interior de Seto en Japón y Hong Kong (Anderson et al., 2001). Los reconocimientos aéreos por aeronaves pequeñas o artefactos no tripulados (ej., drones) pueden ser útiles para detectar posibles áreas de refugio, particularmente cuando se realizan por la mañana antes de que las brisas terrestres puedan dispersar las células de microalgas tóxicas de las aguas superficiales. Para las especies de microalgas ictiotóxicas que matan peces en bajas concentraciones celulares o que se concentran en capas sub- superficiales (ej., capas finas), es posible que no sea factible utilizar estudios aéreos para encontrar un área de refugio real. En tales casos (ej., *Pseudochattonella*), otra estrategia es examinar las distribuciones celulares verticales (a través de recuentos celulares o fluorimetría) en posibles áreas de refugio donde una fuerte mezcla vertical inhibe el crecimiento y diluye las concentraciones superficiales de las especies que producen FANs. En Chile, la normativa vigente no permite transportar las balsas jaulas a otros sectores ni a otros centros de cultivo (D.S Minecon N°319 del 2001). Sin embargo, en pre-alerta y alerta acuícola, el Sernapesca puede autorizar el traslado de ejemplares vivos para prevenir la mortalidad, a través embarcaciones (Minecon N°320 del 2001).

**Ficha 9.** Ficha resumen de mitigación utilizando estrategias de evasión.

<p><b>Funcionamiento:</b></p> <p>Evitar mortalidades masivas de peces sin atacar directamente a las microalgas ictiotóxicas y/o nocivas.</p>
<p><b>Mecanismo de acción:</b></p> <p>-Retiro de la biomasa de peces de la proximidad de especies FANs (Faldones perimetrales, inmersión de jaulas, jaulas con redes profundas, traslado de peces)</p>
<p><b>Especies:</b></p> <p><i>H. akashiwo, Cochlodinium polykrikoides, Karenia mikimotoi, Chattonella antiqua</i></p>
<p><b>Efectividad:</b></p> <p>- Faldones perimetrales: Esta metodología ha mostrado efectividad con floraciones de <i>H. akashiwo</i> en el mar de Salish en la costa Oeste de Estados Unidos 133.</p> <p>- Inmersión de jaulas: En peces fisóstomos como los salmones su efectividad es reducida ya que las jaulas no pueden sumergirse por tiempos muy prolongados.</p> <p>- Jaulas con redes profundas: Se ha evidenciado que los peces tienden a agruparse en la superficie de la columna de agua, aunque tengan la posibilidad de migrar a mayor profundidad por lo que este tipo de instalaciones tiene una efectividad reducida en la mitigación de FANs 138.</p> <p>- Retención del alimento: Es un procedimiento efectivo sólo si el periodo de ayuno de los peces es por periodos cortos 131. Traslado de peces: Es el método más efectivo actualmente, aunque su logística vincula altos costos de operación 135, 136, 137, 139.</p>
<p><b>Condiciones de uso:</b></p> <p>- Detección de zonas libres de especies de microalgas tóxicas y/o nocivas (santuarios).</p> <p>- Conocimiento de la distribución vertical de las microalgas tóxicas y/o nocivas en la columna de agua.</p> <p>- Sitios de cultivo con profundidad suficiente para maniobrar.</p>

<p><b>Ventajas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- No involucra la adición de algún producto químico ó biológico al sistema acuático.</li> </ul> <p>Desventajas.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Algunas operaciones logísticas pueden ser costosas y pueden generar escapes de peces.</li> <li>- Se necesita un alto conocimiento de la ecología y toxicología de la microalga ictiotóxica y/o nociva objetivo.</li> </ul>
<p><b>Impacto ambiental:</b></p> <p>Nulo impacto ambiental, excepto si las maniobras generan escapes de peces en cultivo.</p>
<p>Referencia: 131, 133, 135, 136, 137, 138, 139</p>

### 9.1.5. Comparación entre sistemas de mitigación

La revisión bibliográfica permitió identificar una gran variedad de métodos de mitigación de especies que producen FANs los que incluyen aproximaciones físicas, químicas, biológicas, etc. Estos sistemas pueden ser clasificados en directos, los cuales que son adicionados al ambiente, o son activados cuando se produce una FANs. A su vez, algunos pueden ser utilizados como biocidas que permitan asegurar que procesos, como la descarga de riles de plantas de procesos, o la toma de agua y posterior descarga por parte de wellboat, estén libres de especies nocivas. Por otro lado, existen aquellos métodos que son indirectos y que pueden ser utilizados como medidas de evasión, es decir, mover sistemas de cultivo a lugares libres de FANs o aislarlos de estas. Es importante mencionar que muchas de las medidas de mitigación identificadas han sido probadas a nivel de laboratorio o piloto, y en menor medida han sido evaluadas a escala real.

Si bien en la literatura se puede encontrar información respecto a la efectividad, capacidad de tratamiento e impacto ambiental de las medidas de mitigación, la información respecto a los costos no existe o es imprecisa. Esto se debe a que, por ejemplo:

La evaluación de algunos sistemas de mitigación se hace a nivel de laboratorio, por lo que

no es posible obtener referencias del costo que podría tener si es que la técnica se aplicara a nivel real.

Aun cuando se podría hacer una extrapolación de costos desde una medida de mitigación aplicada a nivel de laboratorio hacia una real, esta podría estar sub o sobrestimada. Esto se debe a que la proyección económica del escalamiento de técnicas incluye costos que muchas veces no son considerados en laboratorio.

Los costos de mitigación son particulares para la magnitud de la floración y las áreas que se pretenden mitigar. Así, por ejemplo, una FAN puede ocurrir a nivel local o abarcar una gran extensión geográfica, como la que generó *A. catenella* en el 2016 que se extendió aproximadamente desde la Región de Aysén hasta la Región de Los Ríos.

Los costos de mitigación son particulares para los procesos o cultivos que se quieren salvaguardar. Por ejemplo, el proceso de mitigación en un wellboat puede depender de la envergadura de la embarcación y de las veces que se va a ocupar el método de mitigación. Estas mismas complejidades ocurren al momento de estimar costos de mitigación en plantas de procesos y centros de cultivo.

Finalmente, los métodos de mitigación muchas veces son proporcionados por distintos proveedores o empresas que ofrecen distintos costos.

Por estas razones en la comparación de los sistemas de mitigación que mostramos a continuación no se incluye información respecto a los costos. Además, las comparaciones se realizaron solo para las especies objetivo de estudio, incluidas en la propuesta (**Tabla 4, 5 y 6**).

**Tabla 4.** Comparación de sistemas para *Alexandrium catenella*.

	Arcillas	UV	Cortina de Burbujas	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ClO <sub>2</sub>	IMTA
	Potencialmente puede eliminar entre 20-95% de la población en condición de floración, aplicando 10 g/L de arcilla.	Inactiva células a dosis mayor a 172 mJ/cm <sup>2</sup> en laboratorio.	Sin datos	Elimina células a concentración de 200 ppm aplicada por 30 minutos en condición de laboratorio.  Para <i>A. ostenfeldii</i> en floración una concentración de 50mg/L puede eliminar el 99.8% de la población.	Concentraciones sobre los 20 ppm genera inhibición del crecimiento en condiciones de laboratorio	Sin información a nivel real.  -En cocultivos algunas macroalgas pueden inhibir el crecimiento de <i>A. catenella</i> (laboratorio).
<b>Capacidad de tratamiento (Aplicabilidad)</b>	Se aplica mezclado arcilla con agua. Se necesitan sistemas hidráulicos y grandes estanques barcos para lanzarla hacia la floración.	Alta versatilidad de aplicabilidad debido a que este sistema de mitigación puede ser instalado en velboats, plantas, etc.	Se aplicaría cercando un sistema de cultivo con una barrera de burbujas.	Preferentemente para ser aplicado en sistemas cerrados o semicerrados.	Preferentemente para ser aplicado en sistemas cerrados o semi-cerrados.	Se aplica cercando o colocando líneas de cultivo de macroalgas alrededor de cultivos de peces/mariscos.
<b>Impacto ambiental (corto, mediano y largo plazo)</b>	Alto impacto ambiental a corto y mediano plazo. Se desconoce efecto de acumulación a largo plazo.	Bajo impacto ambiental a corto, mediano y largo plazo si la mitigación es direccionada	Potencialmente, nulo impacto ambiental.	Bajo impacto debido a que se descompone en el ambiente. Aunque eventualmente puede afectar otras especies ya que no es específico.	Sin datos	Bajo impacto ambiental

**Tabla 5.** Comparación de sistemas para *Karenia selliformis*.

	Arcillas	UV	Cortina de Burbujas	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ClO <sub>2</sub>	IMTA
<b>Efectividad</b>	Potencialmente puede eliminar entre 20-95% de la población en condición de floración, aplicando 10 g/L de arcilla.	Inactiva células a dosis mayor a 172 mJ/cm <sup>2</sup> en laboratorio.	Sin datos	Elimina células a concentración de 200 ppm aplicada por 30 minutos en condición de laboratorio.  Para <i>A. ostensfeldii</i> en floración una concentración de 50 mg/L puede eliminar el 99.8% de la población.	Concentraciones sobre los 20 ppm genera inhibición del crecimiento en condiciones de laboratorio	Sin información a nivel real.  -En cocultivos algunas macroalgas pueden inhibir el crecimiento de <i>A. catenella</i> (laboratorio).
<b>Capacidad de tratamiento (Aplicabilidad)</b>	Se aplica mezclado con agua. Se necesitan sistemas hidráulicos y grandes estanques para lanzarla hacia la floración.	Alta versatilidad de aplicabilidad debido a que este sistema de mitigación puede ser instalado en <i>welboats</i> , plantas, etc.	Se aplicaría cercando un sistema de cultivo con una barrera de burbujas.	Preferentemente para ser aplicado en sistemas cerrados o semicerrados.	Preferentemente para ser aplicado en sistemas cerrados o semicerrados.	Se aplica cercando o colocando líneas de cultivo de macroalgas alrededor de cultivos de peces/mariscos.
<b>Impacto ambiental (corto, mediano y largo plazo)</b>	Alto impacto ambiental a corto y mediano plazo. Se desconoce efecto de acumulación a largo plazo.	Bajo impacto ambiental a corto, mediano y largo plazo si la mitigación es direccionada	Potencialmente, nulo impacto ambiental.	Bajo impacto debido a que se descompone en el ambiente. Aunque eventualmente puede afectar otras especies ya que no es específico.	Sin datos	Bajo impacto ambiental

**Tabla 6.** Comparación de sistemas para *Pseudochattonella verruculosa*.

	Arcillas	UV	Cortina de Burbujas	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ClO <sub>2</sub>	IMTA
Efectividad	Sin datos.	Sin datos.	Se ha probado en esta especie, pero efectividad no ha sido evaluada.	Sin datos.	Sin datos.	Sin datos.
Capacidad de tratamiento (Aplicabilidad)	Potencialmente, Se aplicaría mezclado arcilla con agua. Se necesitan sistemas hidráulicos y grandes estanques y barcos para lanzarla hacia la floración.	Potencialmente, alta versatilidad de aplicabilidad debido a que sistema de mitigación puede ser instalado en welboats, plantas, etc.	Se aplica cercando un sistema de cultivo con una barrera de burbujas.	Preferentemente para ser aplicado en sistemas cerrados o semi-cerrados.	Preferentemente para ser aplicado en sistemas cerrados o semi-cerrados.	Potencialmente se aplicaría cercando o colocando líneas de cultivo de macroalgas alrededor de cultivos de peces/mariscos.
Impacto ambiental (corto, mediano y largo plazo)		Potencialmente, bajo impacto ambiental a corto, mediano y largo plazo si la mitigación es direccionada	Potencialmente, nulo impacto ambiental.			Bajo impacto ambiental.

### 9.1.6. Selección de sistemas de mitigación

Basado en la bibliografía revisada, y de forma preliminar, podemos seleccionar dos sistemas de mitigación los cuales son: aplicación de luz UV y el sistema de burbujeo por surgencia. No obstante, ambos sistemas tienen ventajas y desventajas. Así, esperamos que, hacia el final de este proyecto, y luego de haber realizado las evaluaciones en laboratorio y en el campo, podamos entregar una selección de sistemas de mitigación con una mayor cantidad de antecedentes.

#### Ventajas del sistema UV

-Se ha evaluado el efecto del UV en varias microalgas las que muestran una positiva correlación entre incremento de la dosis y la supresión del crecimiento.

-Los efectos del UV son en varios niveles del organismo, que incluyen desde la disminución

de la integridad celular hasta degradación/mutación de ácidos nucleicos.

-Los avances tecnológicos hacen prever que esta tecnología será mejorada.

### **Desventajas del sistema UV**

-El efecto de la luz UV (supresión del crecimiento de microalgas) puede ser afectado por variables ambientales (salinidad, PH), por lo que éstas deben ser consideradas al momento de evaluarlas y aplicarlas.

-A pesar de que a bajas dosis de UV se genera una supresión del crecimiento, luego de un tiempo las células pueden comenzar a dividirse.

-Existen pocos estudios, tanto en condiciones de laboratorio como en el campo, que evidencien el efecto de las dosis sobre la viabilidad y/o crecimiento de las especies objetivo de esta propuesta i.e. *Alexandrium catenella*, *Karenia selliformis* y *Pseudochattonella verruculosa*.

### **Ventajas del sistema de surgencia**

-Es uno de los sistemas de mitigación de más amplio uso y aplicado hace varios años en Canadá.

-Posiblemente las burbujas generadas desde el centro de la plataforma de cultivo favorezcan el movimiento del agua horizontal arrastrando las células hacia afuera.

-Evaluaciones preliminares realizadas en este proyecto (Floración de *H. akashiwo*) muestran que la aplicación de un sistema de cortina de burbujas no sería tan efectiva para impedir el paso de células. No obstante, la generación de burbujas desde el centro de la plataforma de cultivo favorecería la advección celular hacia fuera del centro de cultivo.

### **Desventajas del sistema de surgencia**

-Existen pocos antecedentes, tanto en condiciones de laboratorio como en el campo, que evidencien el efecto de este sistema.

-En Chile no ha sido evaluado su efecto, por ejemplo, para las especies objetivo de esta propuesta i.e. *Alexandrium catenella*, *Karenia selliformis* y *Pseudochattonella verruculosa*.

-La generación de burbujas genera la mezcla de la columna de agua con consecuencias en las características físicas, químicas y biológicas. Por ejemplo, si las aguas profundas poseen bajos niveles de oxígeno disuelto, esto podría generar una disminución de oxígeno disuelto en la capa superficial de la columna de agua al producirse la mezcla; Si la capa profunda es rica en nutrientes, y por efecto del burbujeo suben, esto podría estimular aún más el crecimiento de las especies FANs; Si las especies que generan FANs se distribuyen en capas finas, el burbujeo podría generar que lleguen a la superficie donde están los peces en cultivo.

#### **9.1.7. Sistematización de normativa**

Para la sistematización de la normativa, se buscó en aquellos países donde se ha realizado investigación sobre sistemas de mitigación de FAN, dentro de los cuales existen principalmente normal-leyes que prohíben la adición de cualquier elemento al agua. A modo de resumen, en general el problema de generar normativas y leyes sobre control y mitigación de eventos FANs se hace de difícil solución, dado que no es técnicamente posible extrapolar soluciones y/o experiencias correctamente e incorporando las variables del modo de empleo, la especie (o cepa) y las características del lugar.

También se incluye información del reporte de la Comisión Intergubernamental Oceanográfica de la UNESCO, sobre FANs y desalinización, que abarca la problemática desde el punto de vista de cuerpos de agua marino-costeros (Anderson et al., 2017).

Por ejemplo, Para los siguientes países-regiones se adjuntan las normas que regulan la utilización de químicos o métodos físico-floculantes o químicos en el medio ambiente en

cuerpos de agua.

## **Estados Unidos (EE.UU.)**

En los Estados Unidos de Norte América existen 3 agencias responsables e involucradas en el control de los eventos de FANs: i) The Environmental Protection Agency (EPA, sigla en inglés) ; ii) el Servicio Nacional de Pesquerías Marinas de la Administración Nacional Oceánica y Atmosférica del Departamento de Comercio de los Estados Unidos (NOAA sigla en inglés); iii) el Departamento de Agricultura (USDA, sigla en inglés) estas son las encargadas evaluar los diferentes métodos de mitigación para remover especies FANs y sus toxinas y que estas técnicas sean ambientalmente y socialmente aceptadas.

De estas 3 instituciones, la principal Agencia Federal que regula la aplicación, control y aplicación de este tipo de tratamientos, es la EPA (*Environmental Protection Agency*), la que dentro de las directrices legales que ha generado, cuenta ya desde el año 1972 con el “Acta de Aguas Limpias (CWA por su sigla en inglés)”, que es la principal ley que establece la estructura para los marcos regulatorios sobre la descarga de contaminantes a cuerpos de agua, luego en el año 1976, con el “Acta de control de sustancias tóxicas”, que en el año 2016 fue actualizada por el “Acta Frank R. Lautenberg de seguridad química para el siglo 21”. Por otro lado, existe el “Acta de prevención a la contaminación” (Ley 42 U.S.C. 13101 et seq. De 1990), que también se refiere a las prácticas que reducen el riesgo de liberar al ambiente sustancias de distinto origen que puedan generar efectos perjudiciales para con el medio ambiente, dentro de estos se encuentra una lista con los elementos que tiene regulación activa (en uso) y aquellos inactivos (no en uso), en este listado se encuentra al peróxido de hidrogeno, por otro lado, el uso del dióxido de cloro también está regulado en base a estudios encargados a al Comité de toxicología del Concejo Nacional de Investigación, quienes determinaron los niveles y la guía de uso en aplicaciones agudas.

De los informes encargados para entregar más información al respecto resalta un estudio

solicitado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Oficina ejecutiva del presidente (2016), donde mediante el trabajo conjunto de diversas agencias se presentan las bases de las estrategias a seguir por el país para investigación y acciones (como mitigación). Al respecto, se puede entender que uno de los factores que limita la aplicación *in situ* de floculantes, Arcillas modificadas u otros métodos que puedan generar la acumulación de toxinas y otros componentes en los fondos blandos y que por ende luego pueda ser resuspendida, están fuera de posibilidad de acción, por el riesgo que esto pueda generar a futuro tanto para los recursos hidrobiológicos de dichas áreas, pero aún más importante, para la salud humana. Por lo mismo a la fecha, no existen información científica o de reportes técnicos en la que, en EE.UU. haya alguna vez realizado una experiencia de mitigación de este tipo en ambientes abiertos, conclusiones similares existen en el report NOAA-PCM HAB, donde los métodos que actúan mediante floculación quedan excluidos de ser testeados por el posible riesgo asociado (Executive Office of the President of the United States, 2016; NOAA, 2015).

## **Europa**

En Europa, si bien cada país tiene sus leyes y normativas, la comunidad europea ha financiado el desarrollo de proyectos de investigación para estudiar la factibilidad de implementar alguna estrategia de mitigación activa (*in situ*) que permita eliminar o reducir y minimizar los efectos de los eventos FAN. Uno de estos es el reporte ASIMUTH (2013), donde finalmente indican que las principales oportunidades de realizar acciones de mitigación existen en relación con mejorar y masificar la implementación de sistemas de monitoreo y modelamiento en tiempo real de los eventos FAN, no así en la implementación de mitigación activa *in situ*, donde cualquiera sea la fórmula empleada (métodos físicos o químicos), puede generar otros efectos para con el medio ambiente.

Distintos países de la comunidad europea, como Alemania, han avanzado en generar estrategias de manejo y mitigación de eventos FAN, pero en este país, solo existen iniciativas a controlar las FAN en ambientes cerrados o cuerpos de agua dulce. De la

misma forma, otros países de Europa solo tienen normativas aplicables a cuerpos de agua dulce, como Francia, Los Países Bajos, Islandia entre otros (Chorus, 2012).

## **Resumen de normativa reporte UNESCO**

A nivel, internacional, existen normativas mayoritariamente a establecer reglas respecto a la presencia y control de toxinas solo en agua dulce, dirigida a lugares donde se realiza captación y procesamiento de agua potable, por lo mismo este reporte es el compendio internacional de información más actualizado a la fecha. De esta forma, el reporte titulado *“Harmful Algal Blooms (HABs) and desalination: A guide to impacts, monitoring, and management”* (en español: “Floraciones Algales Nocivas (FANs) y desalinización: Una guía para el manejo, monitoreo e impactos”) provee de solo sugerencias y recomendaciones de mitigación y lista las normativas existentes en números países, pero todas estas son de uso exclusivo en sistemas de potabilización de agua.

## **Chile**

### **Normativa para la vigilancia, detección y control de especies nocivas.**

La generación y aplicación de las normativas que permite la vigilancia, detección y control de especies nocivas por el Estado Chileno es realizada por parte de instituciones públicas, las cuales en su ámbito de experiencia contribuyen con conocimiento técnico, administrativo y científico. En general, podemos mencionar las siguientes instituciones que participan en esta tarea.

- Subsecretaría de Pesca y Acuicultura (SUBPESCA).
- Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA).
- Dirección General del Territorio Marítimo y de Marina Mercante (DIRECTEMAR).

En general, la normativa actual esta direccionada en la regulaci3n de *Alexandrium catenella*. En el marco del Reglamento de Plagas Hidrobiol3gicas D.S. 345/2005, en 2009 la Subsecretaria de Pesca y Acuicultura (SUBPESCA) declar3 plaga la microalga *A. catenella*, en el 1rea que comprende desde el paralelo 43°22'S y hasta los 55°S (l3mite sur de la Regi3n de Magallanes), por la Res. Ex. N° 177/2009.

El Sernapesca mantiene el Programa de Vigilancia, detecci3n y control de *Alexandrium catenella* (Res.Ex. N° 529/2009 y sus modificaciones, la 3ltima en data es la Res.Ex. N° 6004/2019), mediante el cual se verifica la presencia de esta microalga, en el 100% de las embarcaciones que trasladan peces desde el 1rea declarada FAN, al sur del paralelo 43°22''S hacia la Regi3n de Los Lagos con el objetivo de evitar la dispersi3n de esta especie.

Juntamente con esta medida, se monitorea tambi3n semanalmente la abundancia relativa de esta especie, en una grilla de 4 estaciones cercanas al paralelo 43°22''S, como un sistema monitoreo y alerta temprana de la floraci3n de esta microalga. Adicionalmente, el Servicio vigila la abundancia de todas las especies de microalgas nocivas para peces (ver lista a continuaci3n), incluido *Alexandrium catenella* a trav3s de la Res. Ex. N° 2198/2017 mediante la cual, los titulares informan a Sernapesca cuando en sus monitoreos de rutina las microalgas catalogadas como nocivas para peces, sobrepasan los l3mites establecidos (<http://www.sernapesca.cl/programas/programa-alexandrium-catenella>).

**Tabla 7.** Muestra lista especies incluidas en el monitoreo preventivo.

<b>Microalga</b>	
<i>Heterosigma akashiwo</i>	<i>Leptocylindrus minimus</i>
<i>Dictyocha speculum</i>	<i>Leptocylindrus danicus</i>
<i>Pseudochattonella cf. verruculosa</i>	<i>Rhizosolenia aff. setigera</i>
<i>Alexandrium catenella</i>	<i>Eucampia zodiacus</i>
<i>Karenia spp.</i>	<i>Thalassiosira pseudonana</i>
<i>Karenia mikimotoi</i>	<i>Gymnodinium spp.</i>
<i>Chaetocero convolutus</i>	<i>Azadinium spp.</i>
<i>Chaetoceros cryophilus</i>	<i>Haptophytas</i>

Actualmente existen una serie de protocolos de muestreo asociados al programa de vigilancia y control de *A. catenella* los que incluyen:

- Protocolo muestreo *Alexandrium catenella* en bodegas de wellboat.
- Protocolo muestreo de fitoplancton en contingencias por sospecha de FAN
- Protocolo muestreo para validación de sistemas inactivación de *Alexandrium catenella* por UV en wellboat.

Protocolo muestreo para validación de sistemas de retención inactivación de *Alexandrium catenella* en plantas de proceso.

La aplicación de este protocolo ha permitido validar una serie de métodos físicos y químicos que se muestran a continuación:

**Tabla 8.** Sistemas de inactivación validados en condiciones controladas de laboratorio (Sernapesca)

	Tipo	Dosis	Tiempo	Solidos Suspendidos Totales	Transmitancia
Luz ultravioleta	Lámparas de baja intensidad	180 mJ/cm <sup>2</sup>	-	< 25 mg/L	> 95%.
	Lámparas de mediana intensidad	160.3 mJ/cm <sup>2</sup>	-	< 25 mg/L	> 95%.

	Tipo	Dosis	Tiempo de contacto	Dosis residual	Solidos Suspendidos Totales
Dióxido de Cloro	Dióxido de Cloro generado in situ con el Sistema Closure	10 ppm	5 minutos	4 ppm	<200mg/L.
	Clorodos plus (dióxido de cloro estabilizado al 5%) activado con activador clorodos (Ac. Clorhídrico)	200 ppm	5 minutos	80 ppm	<200mg/L.
	Tressaclor 500 Precursor (dióxido de cloro estabilizado al 5%) activado con activador Diox (Ac. Clorhídrico)	10 ppm	5 minutos	7 ppm	<200mg/L.
Peróxido de Hidrógeno	Properox	200 ppm	30 minutos	-	<200mg/L.
Reactor Electroquímico	Bioionix 6500 y 8500	0.79 (Amperes/L*min)	-	-	<200mg/L.

**Tabla 9.** Sistemas de inactivación validados en condiciones reales a bordo de wellboats.

	Tipo	Dosis validada en wellboats	Tiempo	Solidos Suspendidos Totales
Reactor Electroquímico	Bioionix 6500 y 8500	3,2 (Amperes/L*min)	-	<200mg/L

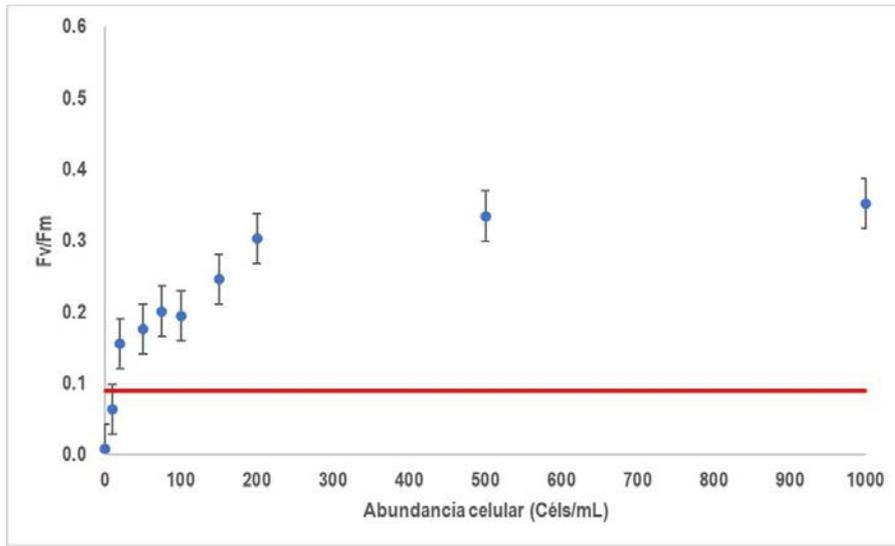
## 9.2 Objetivo específico 2

Realizar experimentos multifactoriales *in vitro* con al menos tres sistemas de control diferentes, utilizando al menos tres microalgas tóxicas chilenas, para cuantificar el efecto sobre las microalgas y sobre la concentración de toxinas en el agua.

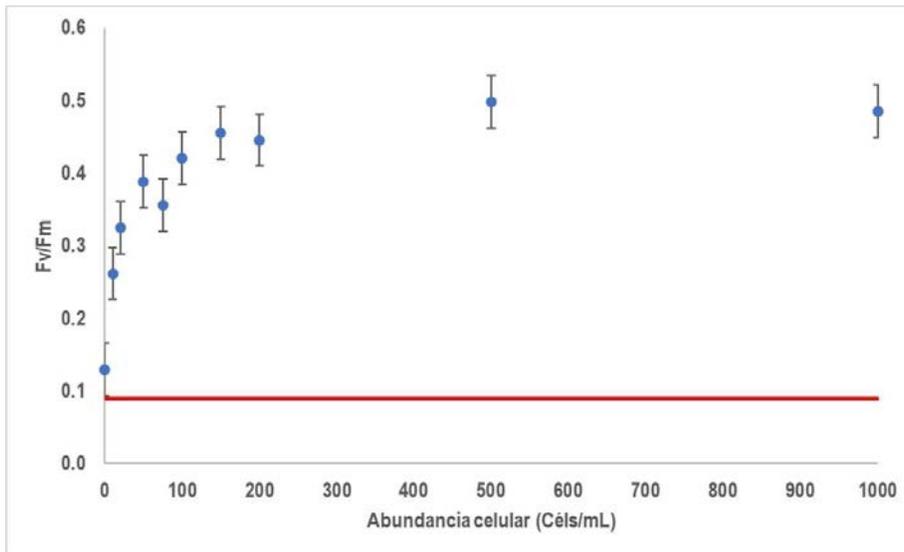
### 9.2.1. Análisis previo de los umbrales

Debido a que toda técnica de medición está limitada a ciertos rangos mínimos de detección, se realizaron pruebas preliminares para determinar los umbrales de detección del sistema FRRf3 para los distintos cultivos de las especies de microalgas tóxicas objetivo. La determinación de los umbrales permitió corregir las abundancias celulares mínimas a utilizar en los distintos experimentos.

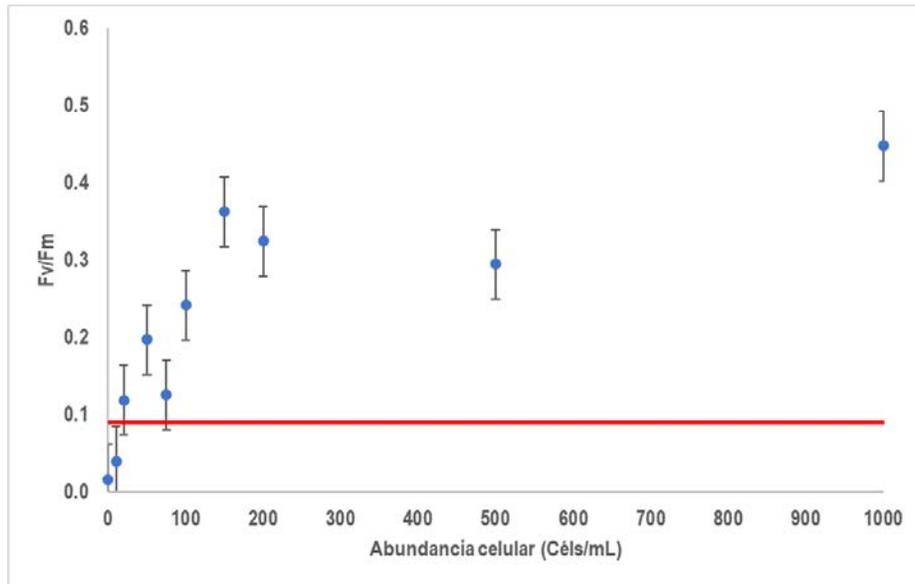
Se consideró una la relación entre las curvas de fluorescencia activa para cada una de las cepas evaluadas y las concentraciones mínimas para obtener una respuesta discreta de fluorescencia desde el fluorómetro. Se observó preliminarmente, que tanto 10 céls/mL de *A. catenella* (cepa CREAN\_AC16) y *K. selliformis* (CREAN\_KS02), como de 10 a 100 céls/mL de *P. verruculosa* no generan una respuesta fotosintética eficiente, por lo que los valores de  $F_v/F_m$  tienden a superponerse con los valores de lectura de blancos (aprox. 0,06), lo que incurre en un error estándar de lectura. En cambio, las concentraciones de 100 y 1000 céls/mL para las cepas CREAN\_AC16 y CREAN\_KS02 muestran valores altos para la razón  $F_v/F_m$  entre 0,4 a 0,5 (**Figuras 34, 35 y 36**).



**Figura 34.** Umbral de detección del método FRRf3 para cultivos de la especie *Karenia selliformis* a distintas concentraciones celulares en base al stock empleado en los tratamientos.



**Figura 35.** Umbral de detección del método FRRf3 para cultivos de la especie *Alexandrium catenella* a distintas concentraciones celulares en base al stock empleado en los tratamientos.



**Figura 36.** Umbral de detección del método FRRf3 para cultivos de la especie *Pseudochattonella verruculosa* a distintas concentraciones celulares en base al stock empleado en los tratamientos.

## 9.2.2 Mitigación para sistemas cerrados

### 9.2.2.1 Peróxido de Hidrógeno

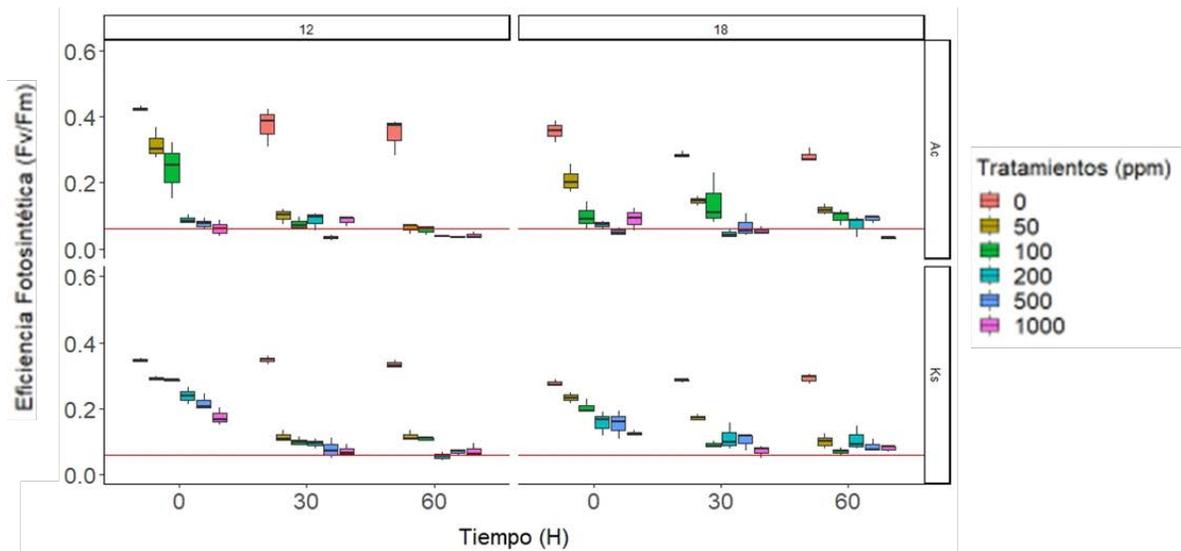
#### 1) Experimentos con monocultivos

Efecto del peróxido de hidrógeno en la respuesta fotosintética de *Alexandrium catenella* (Ac), *Karenia selliformis* (Ks) y *Pseudochattonella verruculosa* (Pv).

Al aplicar los tratamientos de peróxido de hidrógeno a cada una de las especies objetivo se observó una disminución de la eficiencia fotosintética en todas las condiciones, después de 1 hora de exposición.

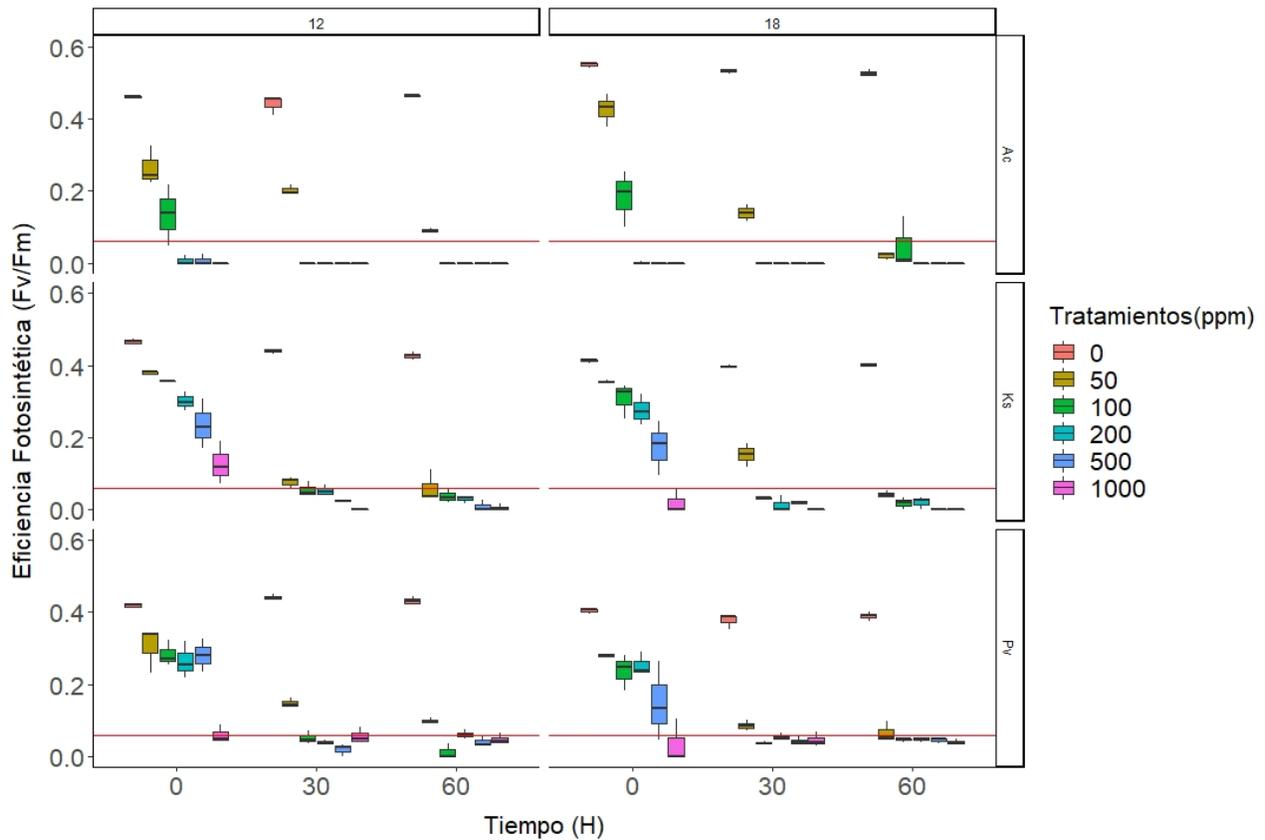
En el caso de *A. catenella* a la condición experimental de 25 psu y 100 céls/mL en las dos condiciones de temperatura, en el T<sub>0</sub> todas las concentraciones de peróxido de hidrógeno disminuyó la eficiencia fotosintética (EF) respecto al control. Adicionalmente, a lo largo del

tiempo la EF disminuye gradualmente en todas las concentraciones (**Figura 37**). En *K. selliformis*, lo obtenido en los cultivos expuestos a distintas concentraciones (50 a 1000 ppm), evidenciaron una disminución en su EF desde T<sub>30</sub> a T<sub>60</sub> (**Figura 37**)



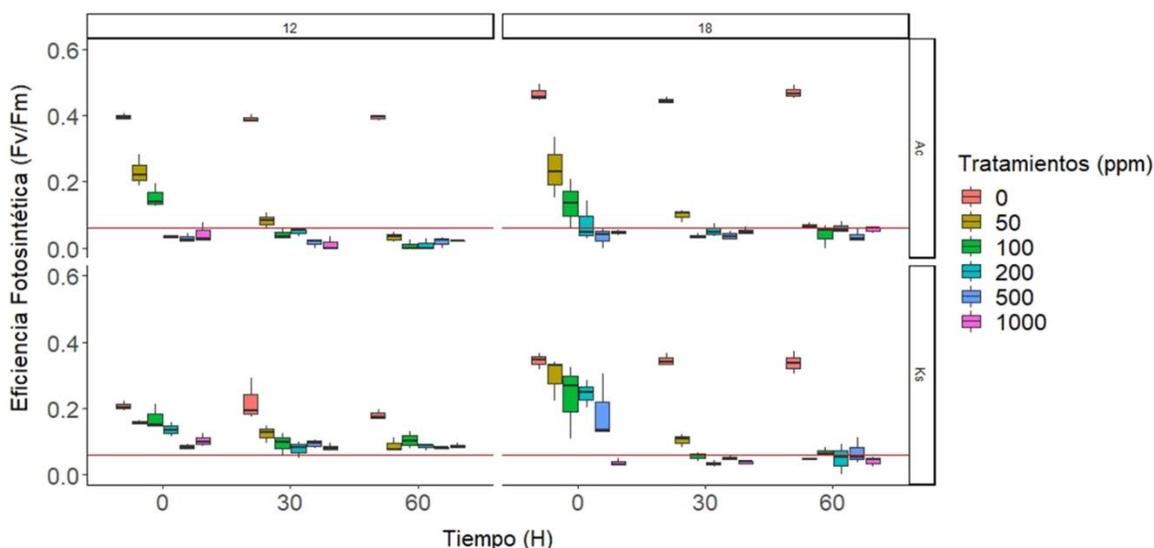
**Figura 37:** Eficiencia fotosintética de *A. catenella* (Ac) y *K. selliformis* (Ks) a 100 céls/mL a 25 psu y dos temperaturas 12 - 18°C, expuestos a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno

En la condición experimental de **25 psu, 12 °C y 1000 céls/mL**, *Alexandrium catenella* en en cada una de las concentraciones experimentales (desde 50 a 1000 ppm), se observó una disminución de la EF desde el T<sub>0</sub> en adelante, evidenciando en el T<sub>60</sub> una eficiencia de 0 en los tratamientos 100-1000 ppm(**Figura 38**). Para *K. selliformis*, los tratamientos a distintas concentraciones (50–1000 ppm) mostraron una disminución en su EF respecto al control desde T<sub>0</sub> (**Figura 38**). En el caso de *P. verruculosa*, en las distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se observó a medida que se incrementa el tiempo de exposición (T<sub>0</sub> a T<sub>60</sub>), se reduce la EF de los cultivos, siendo un patrón similar en todas la temperatura 18 °C para todas las especies en estudio (**Figura 38**).



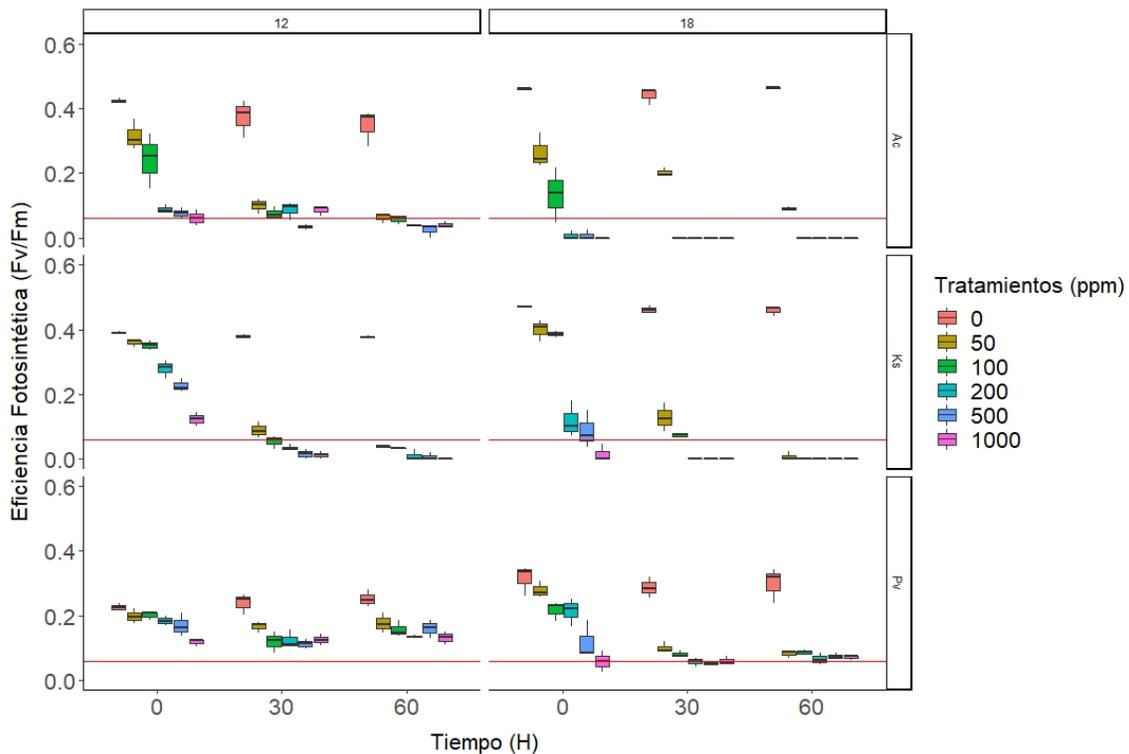
**Figura 38:** Eficiencia fotosintética de *A. catenella* (Ac), *K. selliformis* (Ks) y *P. verruculosa* (Pv) a 1000 céls/mL a 25 psu y dos temperaturas 12 - 18°C, expuestos a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno durante un periodo tiempo de 60 min.

En la condición experimental **33 psu, 12°C y 100 céls/mL**, en *A. catenella* los tratamientos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 a 1000 ppm) disminuyeron su EF (**Figura 39**). En el caso de *K. selliformis* los tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, evidenciaron una baja en EF, a medida que aumentan las concentraciones (50 a 1000 ppm) y el tiempo de exposición (T<sub>0</sub> a T<sub>60</sub>) (**Figura 39**). Este patron ocurre tambien a loas 18°C.



**Figura 39.** Eficiencia fotosintética de *A. catenella* (Ac), y *K. selliformis* (Ks) a 100 céls/mL a 33 psu y dos temperaturas 12 - 18°C, expuestos a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno durante un periodo tiempo de 60 min.

*A. catenella* a 33 psu, 12°C y 1000 céls/mL, se observó una disminución de la EF a medida que aumenta las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, entre los tiempos T<sub>30</sub> a T<sub>60</sub>. El tratamiento con 1000 ppm no registró EF para ninguno de los tiempos experimentales (**Figura 40**). Caso similar se observó en *K. selliformis*, los tratamientos desde T<sub>0</sub> a T<sub>60</sub>, se observa una pérdida de la EF medida que se aumenta la concentración H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Figura 40**). El control de *P. verruculosa* presento en todos los tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mostraron una perdida de EF, disminuyendo a medida que aumentó el tiempo de exposición al químico (**Figura 40**). En la temperatura 18°C, se observó el mismo patrón de disminución que a 12°C, sin embargo, en el T<sub>0</sub> la disminución de la EF en las 3 especies fue mayor respecto al control.



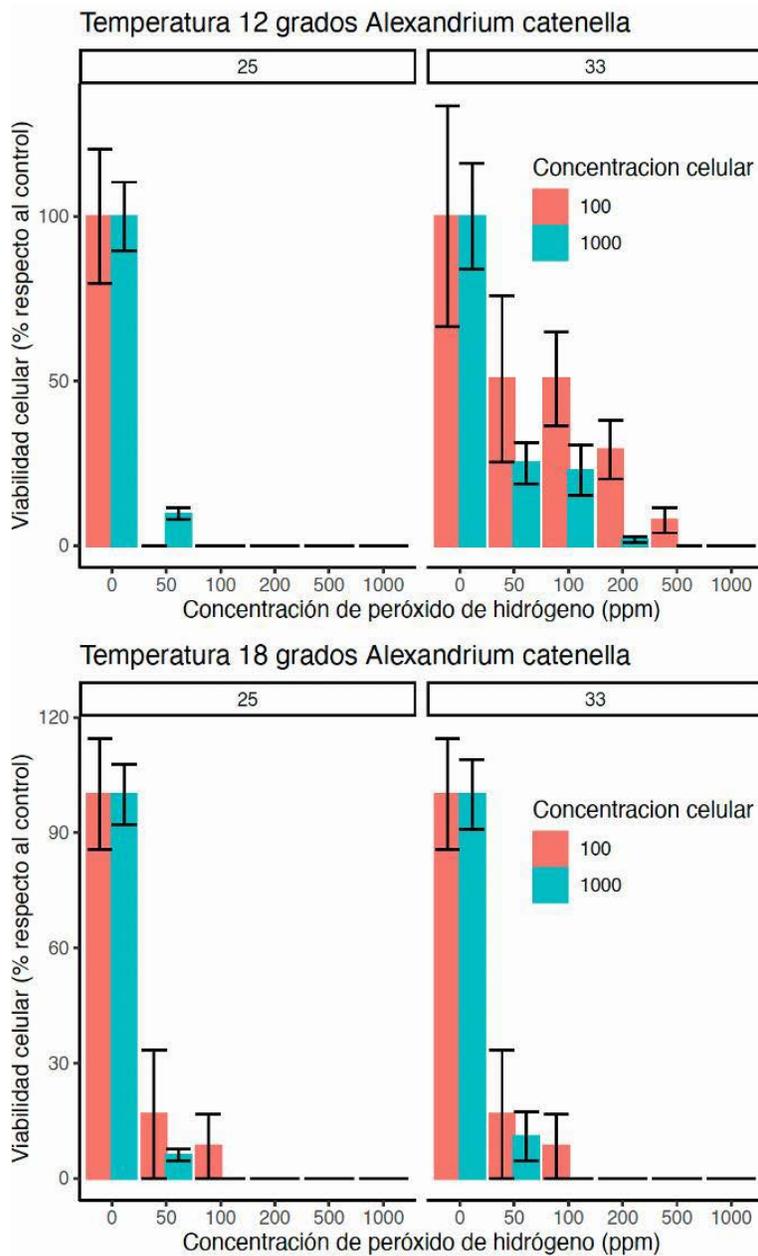
**Figura 40:** Eficiencia fotosintética de *A. catenella* (Ac), *K. selliformis* (Ks) y *P. verruculosa* (Pv) a 1000 céls/mL a 33 psu y dos temperaturas 12 – 18 °C, expuestos a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno durante un periodo tiempo de 60 min.

Efecto del peróxido de hidrógeno en la viabilidad de *A. catenella* (Ac), *K. selliformis* (Ks) y *P. verruculosa* (Pv).

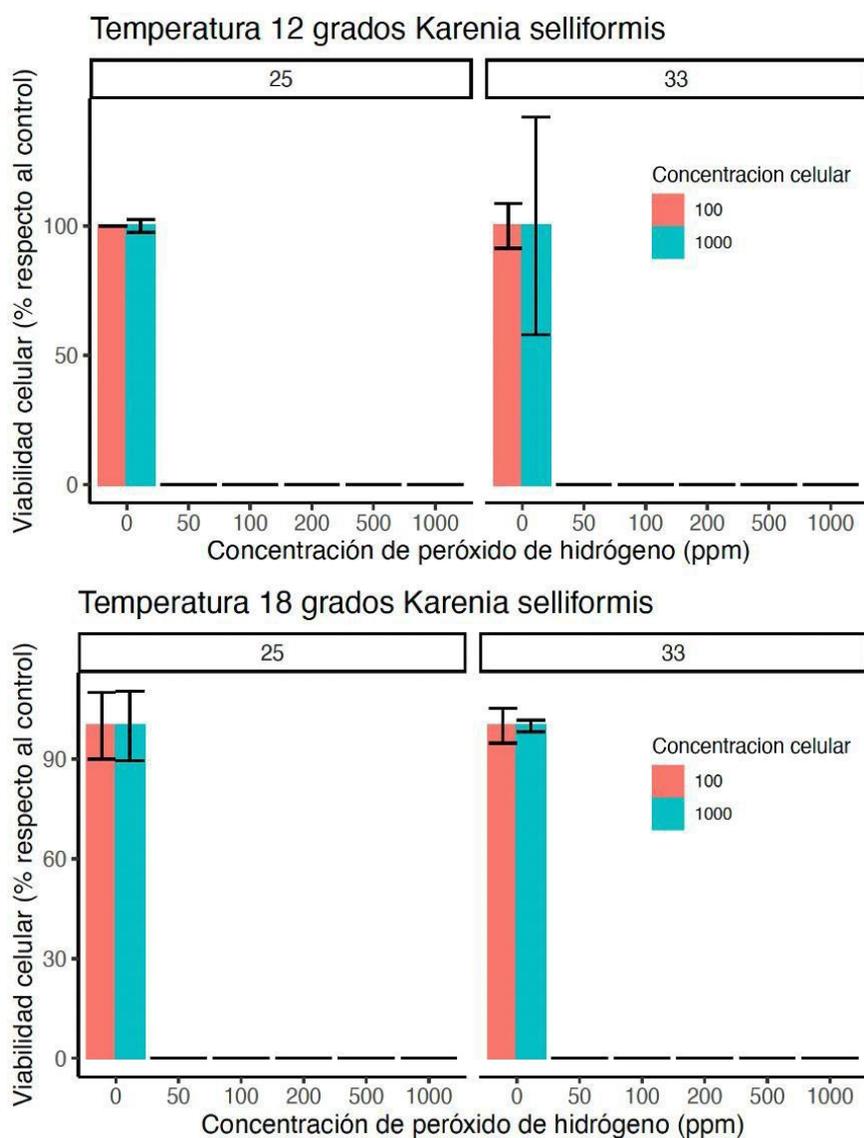
La evaluación de la viabilidad celular de *A. catenella* (Ac) a 100 y 1000 céls/mL, al ser expuesta a 5 concentraciones de peróxido de hidrogeno, por 60 minutos, en condiciones experimentales de 12°C temperatura, 25 de salinidad mostró valores mayoritariamente cercanos a 0%. Por su parte, al ser expuestas a concentraciones de 500 y 1000 ppm y salinidad de 33 se observaron valores cercanos al 0%, tanto para concentraciones celulares de 100 y 1000 céls/mL. La viabilidad disminuyo cerca al 50 % cuando las células fueron expuestas a concentraciones de 50 y 100 ppm en la concentración celular de 100 céls/mL. En tanto, la exposición a 200 ppm en la concentración celular de 1000 céls/mL, la viabilidad fue cercana a 0%. A la misma concentración celular utilizando concentraciones

de 50 y 100 ppm, la viabilidad fue cercana al 25%. Al aumentar la temperatura a 18 °C y exponer las células a concentraciones de 200, 500 y 1000 ppm de peróxido de hidrógeno, tanto a 100 y 1000 céls/mL, y salinidad de 25 y 33, se observaron valores de viabilidad celular de 0%. En las mismas condiciones, pero con concentraciones de 50 y 100 ppm se observaron porcentajes de viabilidad cercanos al 15% (**Figura 41**).

La evaluación de la viabilidad celular de *K. selliformis* (100 y 1000 céls/mL) al ser expuesta a las diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno, por 60 minutos, en condiciones experimentales de 12°C, 25 y 33 de salinidad, mostró valores de 0%. Similarmente, en la temperatura 18 °C en las mismas condiciones experimentales mencionadas anteriormente, la viabilidad fue de 0% (**Figura 42**).



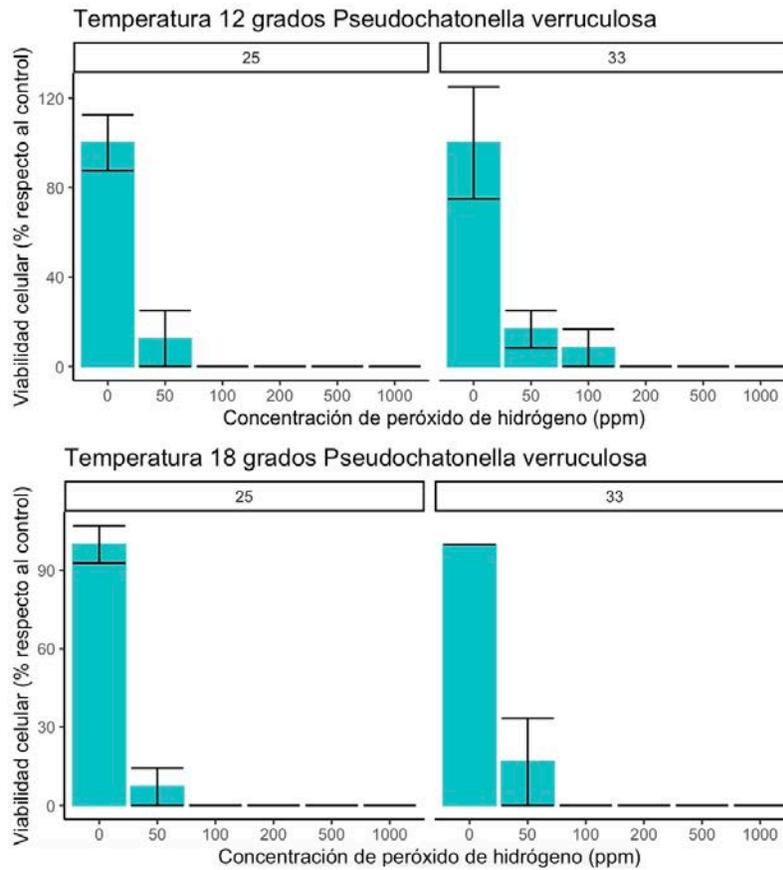
**Figura 41:** Porcentaje de la viabilidad celular de *Alexandrium catenella* luego de ser expuestas a peróxido de hidrogeno en concentraciones de 0, 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm por 60 minutos y a diferentes condiciones experimentales de temperatura (12° y 18° C), salinidad (25 y 33 ) y densidad celular (100 y 1000 céls/mL).



**Figura 42:** Porcentaje de la viabilidad celular de *Karenia selliformis* luego de ser expuestas al peróxido de hidrogeno en concentraciones de 0, 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm por 60 minutos y a diferentes condiciones experimentales de temperatura (12° y 18° C), salinidad (25 y 33) y densidad celular (100 y 1000 céls/mL).

La viabilidad celular de *P. verruculosa* en condiciones de 12°C, 25 y 30 de salinidad, en todas las concentraciones de peróxido de hidrógeno disminuyó respecto al control. En específico en 200, 500 y 1000 ppm, en condiciones experimentales de 12°C, 25 y 30 de salinidad, tuvo 0% de viabilidad. En tanto que, la exposición de células a 50 ppm, utilizando 25 y 33 de salinidad, generó una viabilidad de aproximadamente 10%. A 100 ppm y 25 de

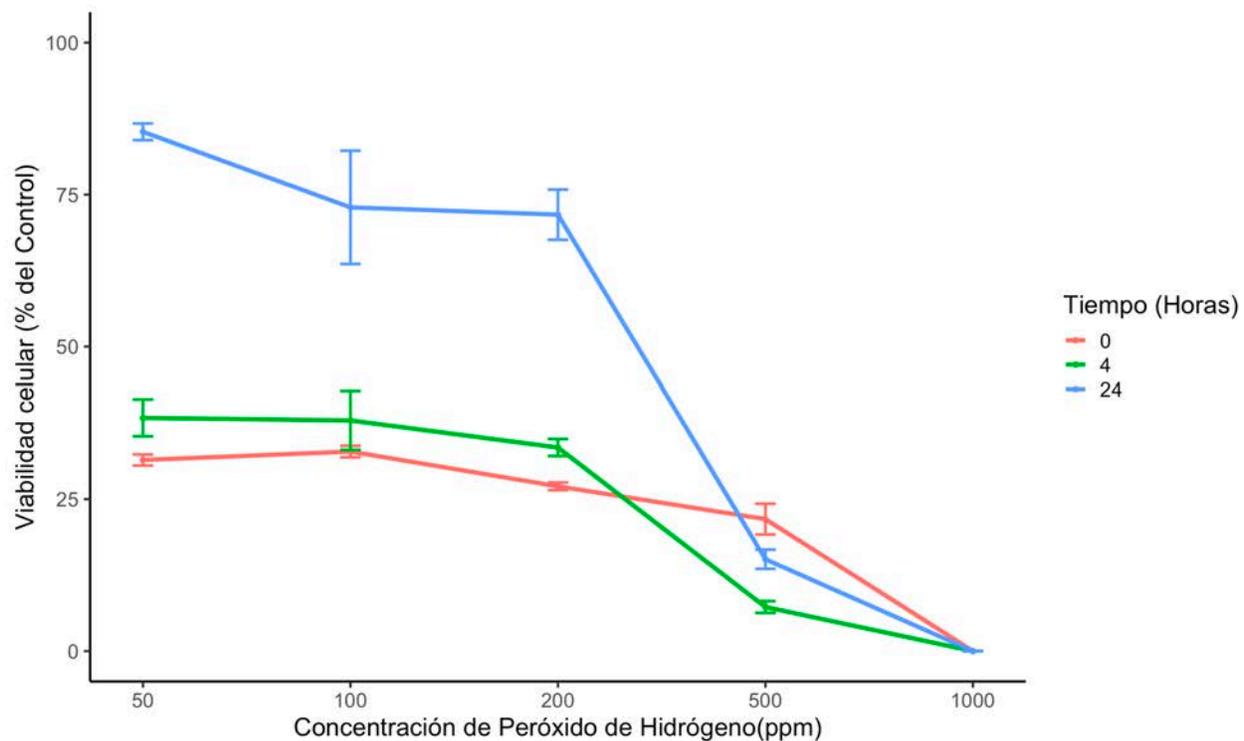
salinidad la viabilidad fue de 0%. A la misma concentración de peróxido de hidrógeno, pero a 33 de salinidad, se observó un valor de 10%. A temperatura de 18 °C en las mismas condiciones descritas anteriormente, las células de *P. verruculosa* desde los 100pp tuvieron una viabilidad celular de 0%. No obstante, en la exposición a 50 ppm se registraron valores de viabilidad cercanos a 15% (**Figura 43**).



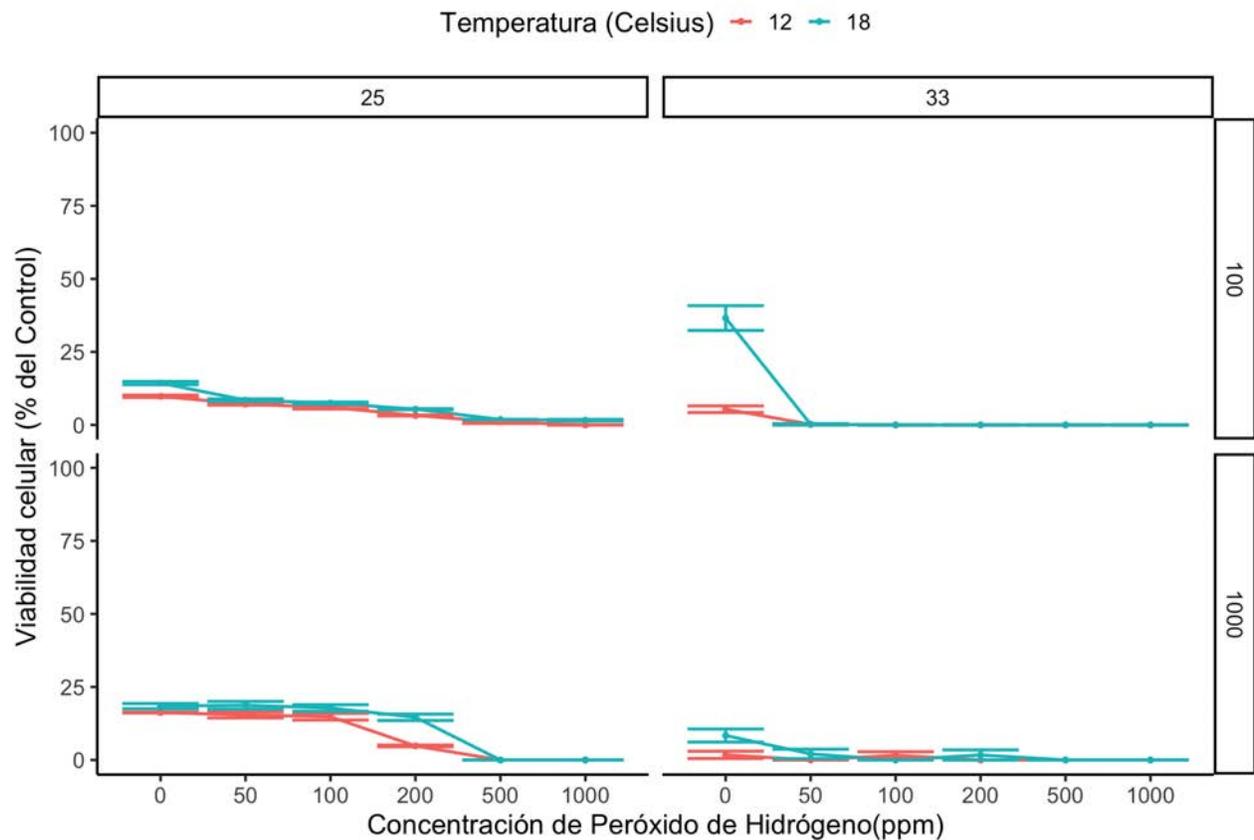
**Figura 43:** Porcentaje de la viabilidad celular de *P. verruculosa* luego de ser expuestas al peróxido de hidrogeno en concentraciones de 0, 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm por 60 minutos y a diferentes condiciones experimentales de temperatura (12° y 18° C) y salinidad (25 y 33).

## Viabilidad de líneas celulares branquiales de trucha frente a la exposición de peróxido de hidrógeno.

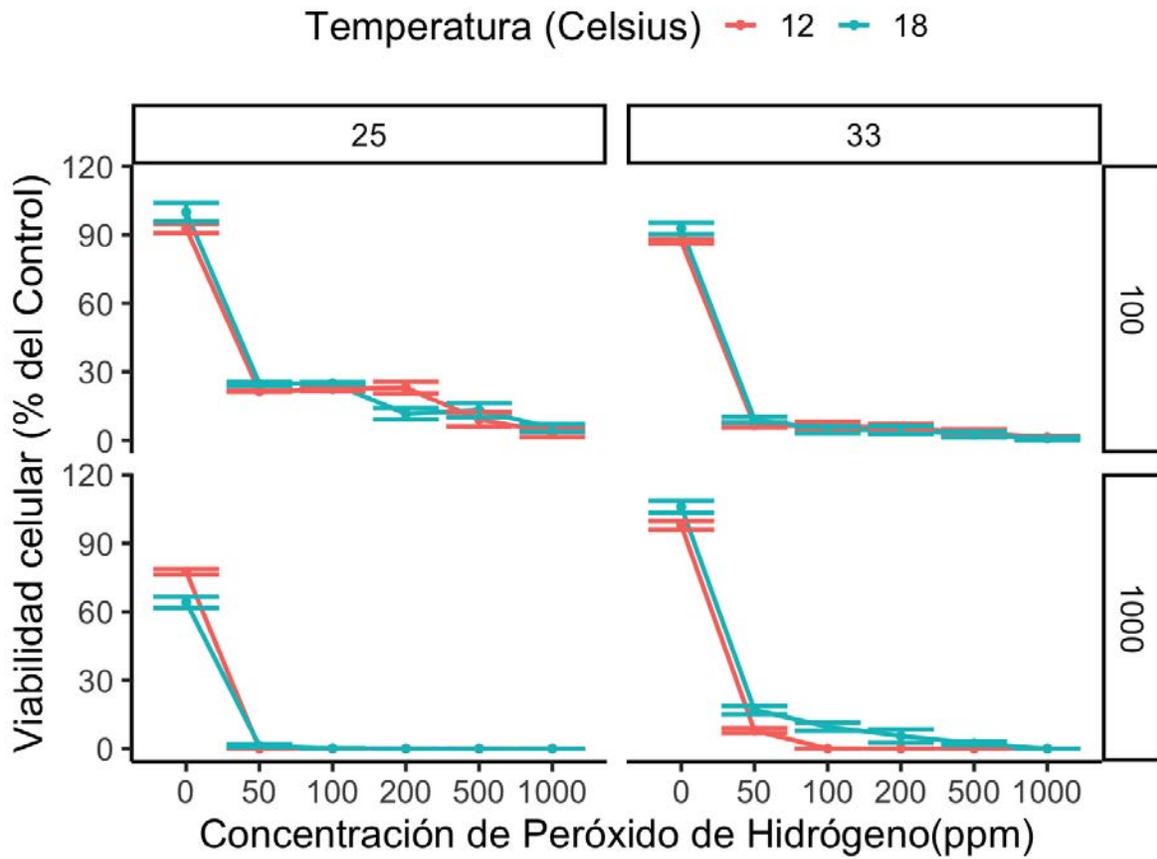
En la siguiente sección se presentan resultados de la respuesta en viabilidad de líneas celulares branquiales RTgill-W1 frente a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno y su sinergia con la presencia de microalgas nocivas y/o comunidad fitoplanctónica. El peróxido de hidrógeno por sí solo presenta una alta toxicidad a las líneas celulares a mínimas dosis de 50 ppm a las 0 y 4 horas de inoculado en el agua, disminuyendo la viabilidad celular a menos del 50%. A las 24 horas, la viabilidad disminuye levemente en los tratamientos 50, 100 y 200 ppm, sin embargo, en los tratamientos 500 y 1000 ppm la viabilidad es menor al 50 % (**Figura 44**). Cuando las líneas celulares son expuestas a microalgas altamente citotóxicas como *K. selliformis* más la adición de peróxido de hidrógeno (**Figura 45**), el efecto de diferentes temperaturas (12 y 18 °C) y salinidades (25 y 33) del medio es menos evidente cuando las microalgas expuestas a estas condiciones son menos citotóxicas (ej., *A. catenella*) (**Figura 46**). La adición de mayor biomasa microalgal en combinación con microalgas tóxicas, muestra un significativo incremento de la citotoxicidad del medio experimental cuando se agrega peróxido de hidrógeno. Este resultado sugiere un efecto sinérgico entre el peróxido de hidrógeno y los lípidos presentes en las microalgas (lipoperoxidación) (**Figura 46 y 47**).



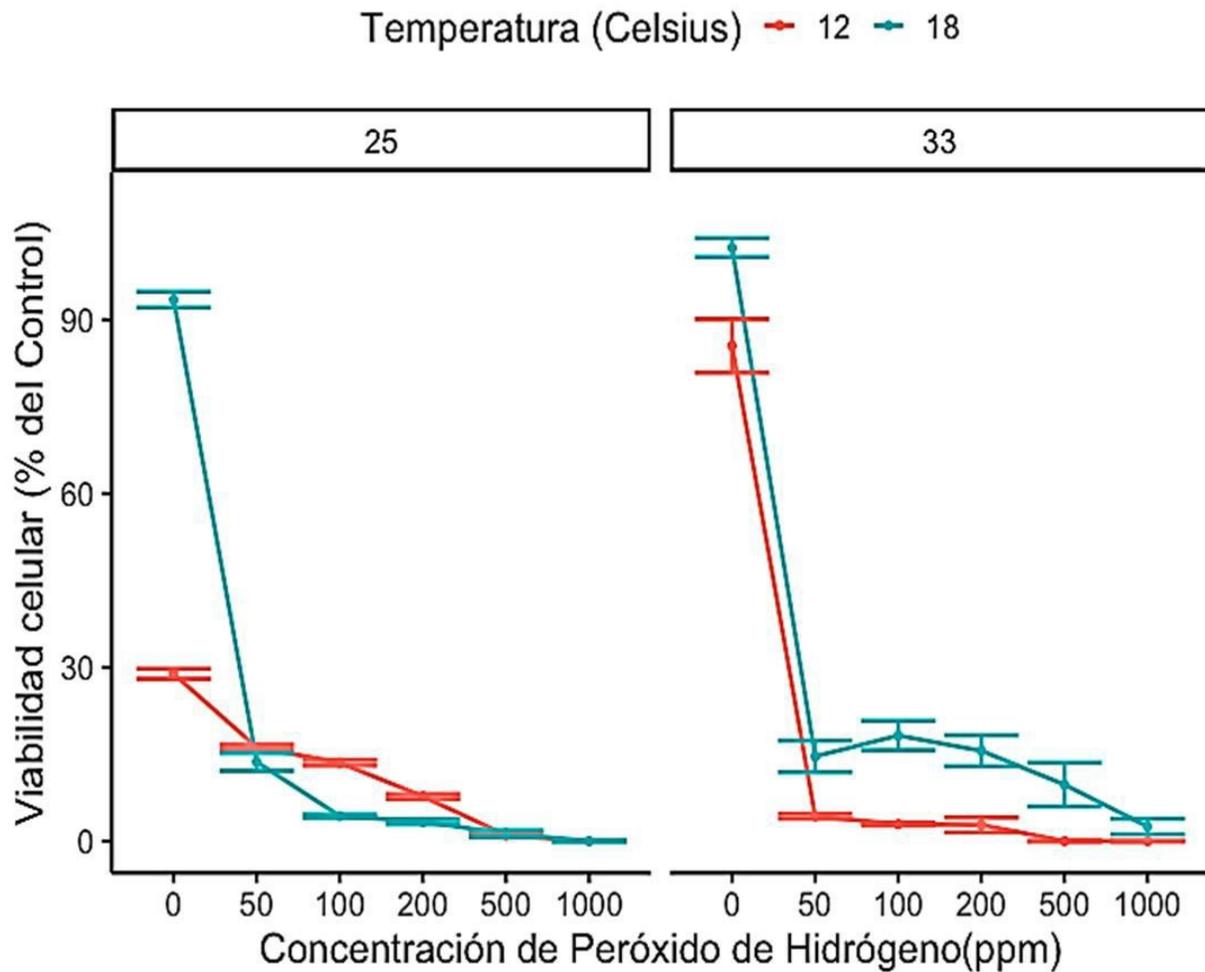
**Figura 44:** Efecto de diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno diluido (50 a 1000 ppm) en agua de mar filtrada (0,22  $\mu\text{m}$ ) en la viabilidad de células branquiales (RTgill-W1) durante 120 min. Línea roja tiempo 0, línea verde 4 horas de peróxido añadido al agua de mar, línea azul 24 horas de peróxido añadido al agua de mar. Las barras representan la media y la desviación estándar de la viabilidad celular de mediciones por cuadruplicado.



**Figura 45:** Efecto de diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno diluido (50 a 1000 ppm) en agua de mar filtrada (0,22  $\mu$ m) conteniendo 100 céls/mL y 1000 céls/mL de *K. selliformis* en la viabilidad de células branquiales (RTgill-W1) durante 120 min a 12 y 18 °C. Las barras representan la media y la desviación estándar de la viabilidad celular de mediciones por cuadruplicado.



**Figura 46:** Efecto de diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno diluido (0 a 1000 ppm) en agua de mar filtrada (0.22  $\mu\text{m}$ ) conteniendo 100 céls/mL y 1000 céls/mL de *A. catenella* en la viabilidad de células branquiales (RTgill-W1) durante 120 min a 12 y 18 °C de temperatura y a 25 y 33 de salinidad. Las barras representan la media y la desviación estándar de la viabilidad celular de mediciones por cuadruplicado.



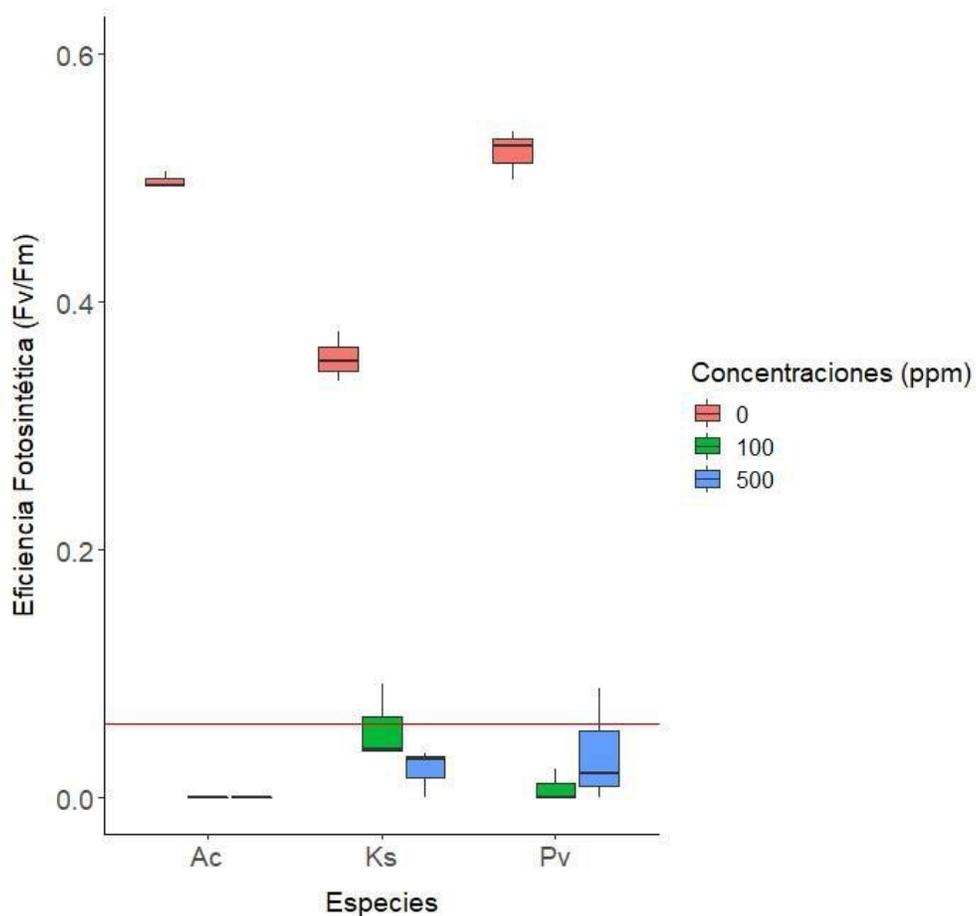
**Figura 47:** Efecto de diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno diluido (0 a 1000 ppm) en agua de mar filtrada (0,22  $\mu$ m) conteniendo 1000 céls/mL de *P. verruculosa* en la viabilidad de células branquiales (RTgill-W1) durante 120 min a 12 y 18 °C. Las barras representan la media y la desviación estándar de la viabilidad celular de mediciones por cuadruplicado.

## 2) Experimentos con monocultivos con fitoplancton

Efecto del peróxido de hidrógeno en la respuesta fotosintética de *A. catenella* (Ac), *K. selliformis* (Ks) y *P. verruculosa* (Pv) con fitoplancton.

La condición experimental consideró abundancia celular de 1000 céls/mL, a una salinidad de 33 y temperatura de 18 °C, para cada monocultivo (controles - 0 ppm). Se evidenció

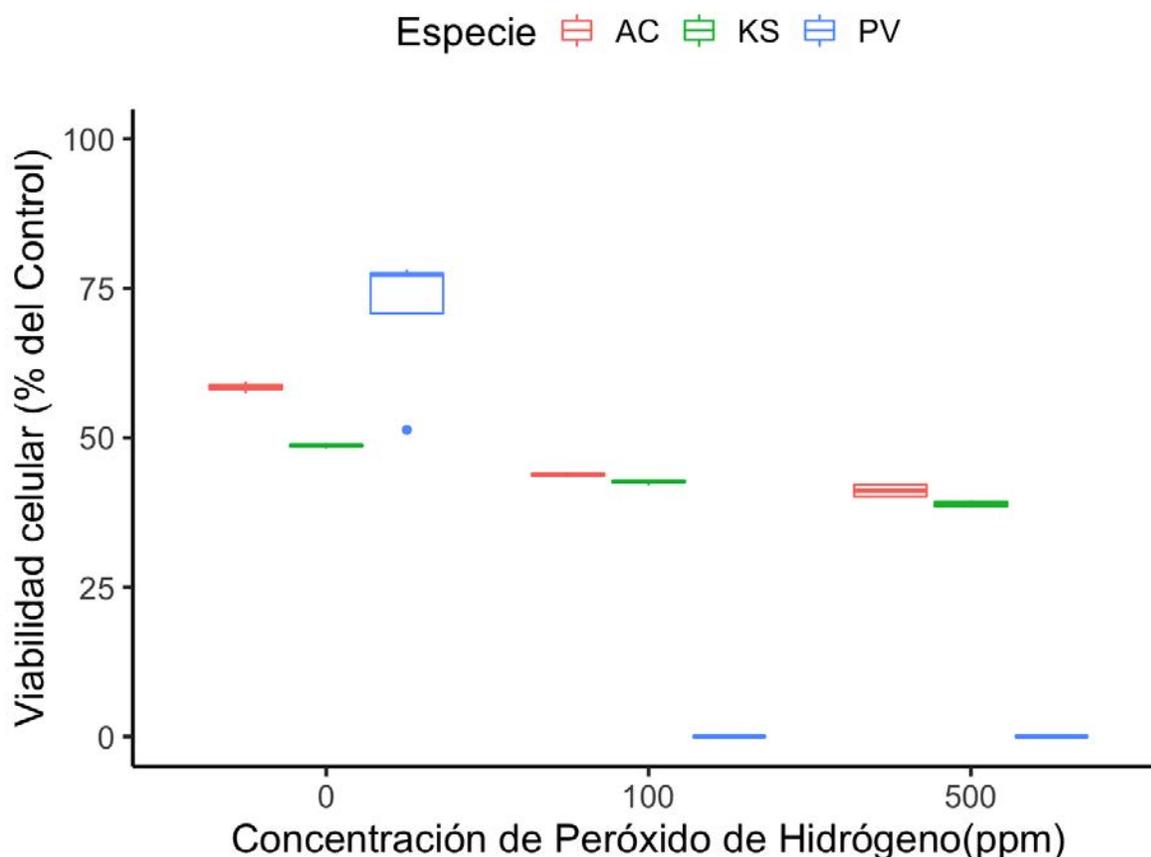
una leve variabilidad de la eficiencia fotosintética para los controles, lo cual puede estar asociado al tamaño celular ( $\mu\text{m}$ ) de las diferentes especies de interés que se analiza. Se examinó, la respuesta de los tratamientos a bajas (100 ppm) y altas (500 ppm) concentraciones de peróxido de hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y a distintos tiempos de exposición (0, 30 y 60 min). Se observó una disminución de la eficiencia fotosintética (EF) de cada cultivo en el tiempo. Los rangos de distribución de las lecturas de EF fueron similares para los dos tratamientos, ubicando la lectura del equipo FRRf bajo la línea de mortalidad (línea roja), evidenciando la eficiencia del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , como medio de mitigación sobre la comunidad experimental (**Figura 48**).



**Figura 48.** Eficiencia fotosintética ( $F_v/F_m$ ) de *A. catenella* (Ac), *K. selliformis* (Ks) y *P. verruculosa* (Pv) con una comunidad fitoplancton (1000 céls/mL), expuestas a dos tratamientos con distintas concentraciones de peróxido de hidrogeno (0, 500 y 500 ppm) durante una hora.

Efecto del peróxido de hidrógeno en la viabilidad de líneas celulares *A. catenella* y *K. selliformis* con fitoplancton.

La evaluación de la viabilidad de celular de la especie *P. verruculosa* con fitoplancton expuesto a peróxido de hidrógeno 100 y 500 ppm presentó valores de 0% de viabilidad, mientras tanto las especies *A. catenella* y *K. selliformis* con fitoplancton mostró una viabilidad celular menor al 50 %, sin embargo, esto se puede deber a que la muestra fue congelada previamente para exponerla en las líneas celulares y la congelación pudo generar que perdieran su toxicidad (**Figura 49**).

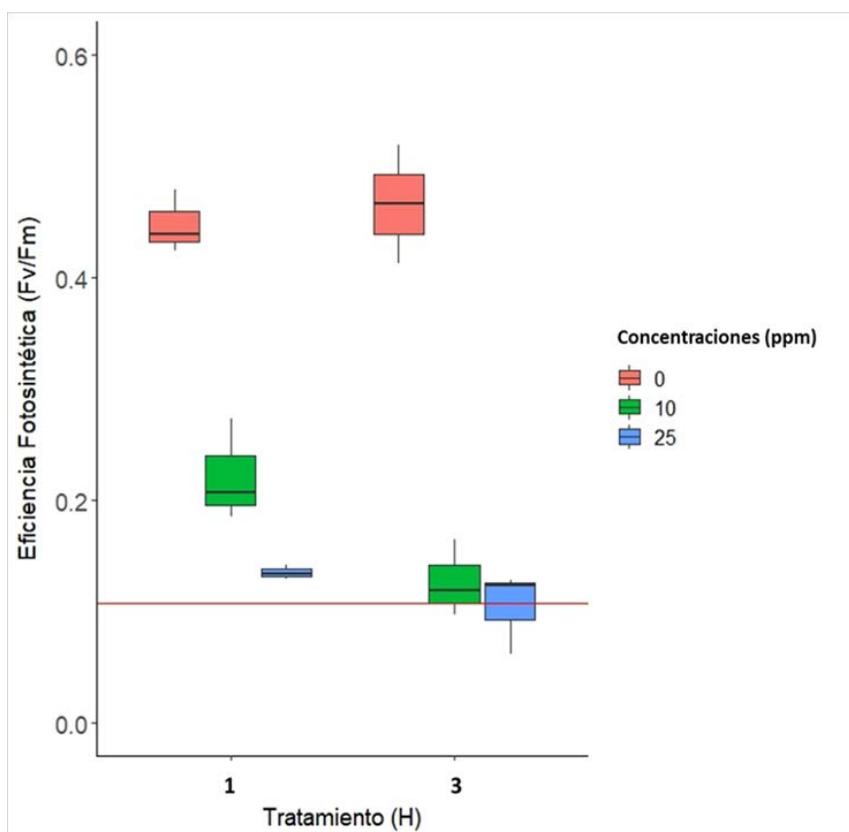


**Figura 49:** Efecto del peróxido de hidrógeno sobre microalgas objetivo con fitoplancton en la viabilidad de células branquiales. Los tratamientos del químico fueron 0, 100 y 500 ppm. A una densidad celular de 1000 céls/mL de *A. catenella* (AC), *K. selliformis* (KS) y *P. verruculosa* (PV) y 1000 céls/mL de fitoplancton. Las mediciones se hicieron por cuadruplicado.

### 3) Experimentos en terreno con mesocosmos

#### Efecto del peróxido de hidrógeno en la respuesta fotosintética del mesocosmos del fiordo Comau

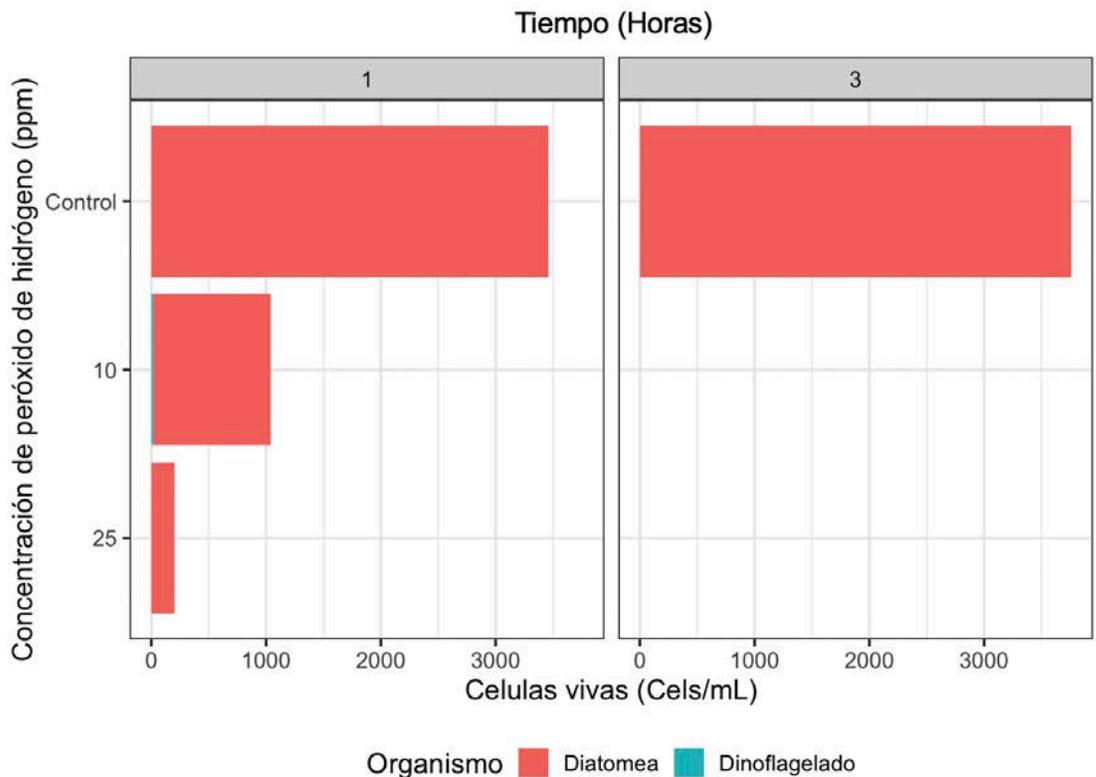
En la evaluación del estado fisiológico del mesocosmos del fiordo Comau expuesto a peróxido de hidrogeno 10 y 25 ppm, este presentó una disminución de la eficiencia fotosintética (EF) posterior a la hora de exposición y finalmente a las 3 horas ambos tratamientos redujeron considerablemente la EF (**Figura 50**).



**Figura 50:** Eficiencia fotosintética (Fv/Fm) el mesocosmos del fiordo Comau expuestas a dos tratamientos con distintas concentraciones de peróxido de hidrogeno (0, 10 y 25 ppm) en dos tiempos 1 y 3 horas posterior a iniciado el experimento.

### Efecto del peróxido de hidrógeno en la viabilidad del mesocosmos del fiordo Comau

Se evaluó la viabilidad de células fitoplanctónicas presentes en el mesocosmos del fiordo Comau expuesto a peróxido de hidrógeno 10 y 25 ppm, en el cual, se observó una disminución en la viabilidad celular en ambos tratamientos a la hora de experimentación, en contraste con el control. Mientras que a las 3 horas de iniciado el tratamiento no se observaron células vivas (Figura 51)

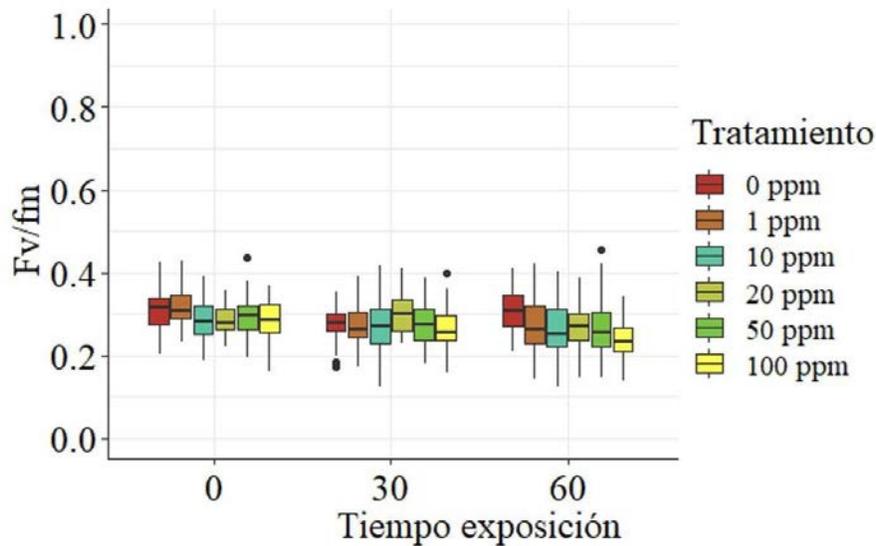


**Figura 51:** Efecto del peróxido de hidrógeno en la viabilidad celular de fitoplancton. Se sometieron a 2 concentraciones del reactivo (10 y 25 ppm) y se midió al tiempo 1 y 3 horas posterior a iniciar el experimento. En rojo organismos clasificados como Diatomeas y en azul organismos clasificados como Dinoflagelados.

### 9.2.2.2. Dióxido de cloro

#### Efecto del dióxido de cloro en la respuesta fotosintética de *K. selliformis*

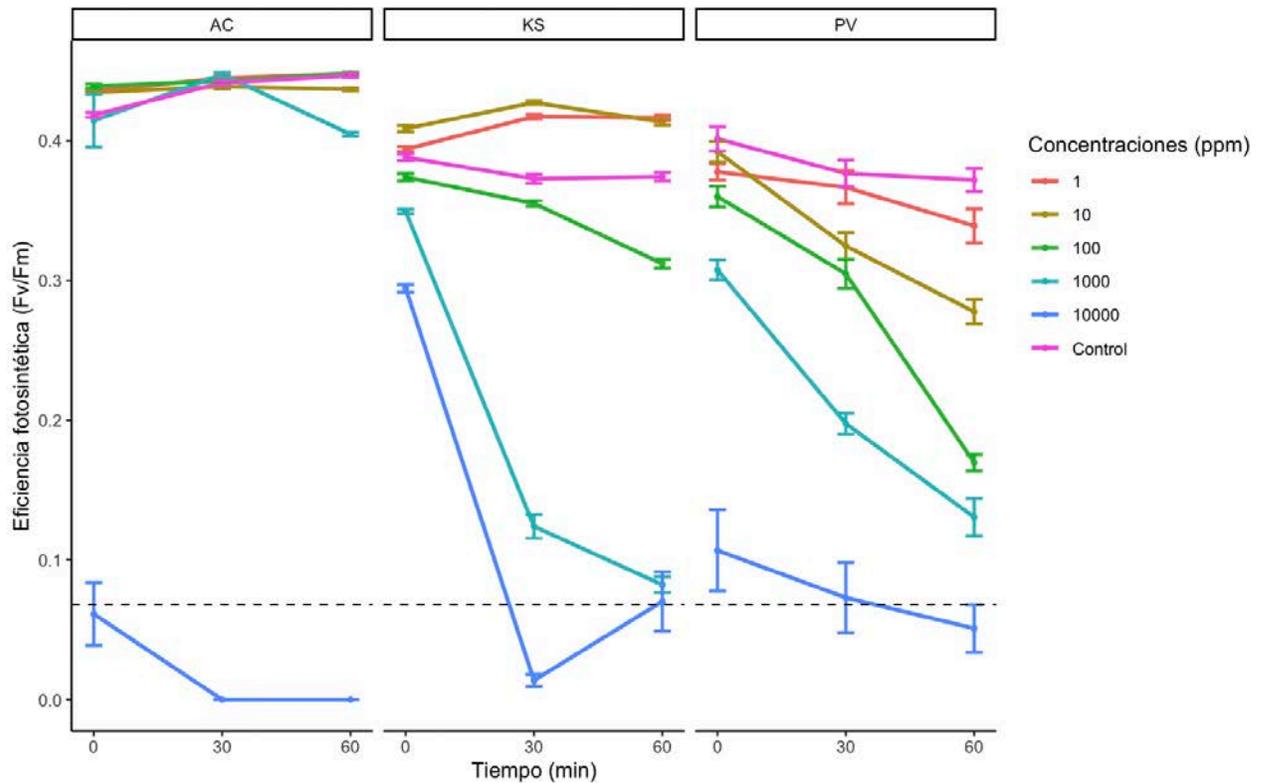
En una primera etapa se observó que la exposición de *K. selliformis* a distintas concentraciones de dióxido de cloro, por 0, 30 y 60 minutos, no mostró cambios sustanciales de la eficiencia fotosintética cuando se comparó con el control. Esto indica que una concentración de 100 ppm, concentración máxima utilizada en la evaluación, no fue suficiente para afectar a las células. Debido a esto en los siguientes experimentos se incluyeron concentraciones más altas de dióxido de cloro (**Figura 52**)



**Figura 52:** Efecto temporal (0 a 60 min) de distintas concentraciones de dióxido de cloro en la eficiencia fotosintética de *K. selliformis*.

Considerando los resultados previos, en una segunda etapa se utilizaron concentraciones de dióxido de cloro extremadamente altas como 1000 y 10000 ppm. La evaluación de la exposición de las especies FANs al dióxido de cloro mostró respuestas distintas. Para *Alexandrium catenella*, se observó que su exposición a concentraciones de dióxido de

cloro de 1, 10, 100 y 1000 ppm, por 0, 30 y 60 minutos, no generó cambios sustantivos de su eficiencia fotosintética. No obstante, al ser expuesta a una concentración de 10000 ppm las células fueron severamente afectadas lo que resultó en valores de eficiencia fotosintética cercanos a cero. Para *Karenia selliformis*, se observó que la exposición a concentraciones bajas de dióxido de cloro de 1, 10 y 100 ppm no afectó su eficiencia fotosintética. Por el contrario, su exposición a 1000 y 10000 ppm afectó inmediatamente su eficiencia fotosintética. Luego de 30 y 60 minutos de exposición, se observó una progresiva disminución de la eficiencia alcanzando valores bajo los 0,1 (Fv/fm) indicando la mortalidad de las células. Finalmente, para *Pseudochattonella verruculosa*, no se observaron efectos sobre la eficiencia fotosintética al exponerla a 1 ppm de dióxido de cloro. Además, aunque se observaron valores más bajos de eficiencia al exponer las células a 10, 100 y 1000 ppm, los que progresivamente bajaron luego de 30 y 60 minutos de exposición, no se evidenció una mortalidad severa. Similarmente, la eficiencia fotosintética de *A. catenella* y *K. selliformis* se vio severamente afectada a 10000 ppm (**Figura 53**).

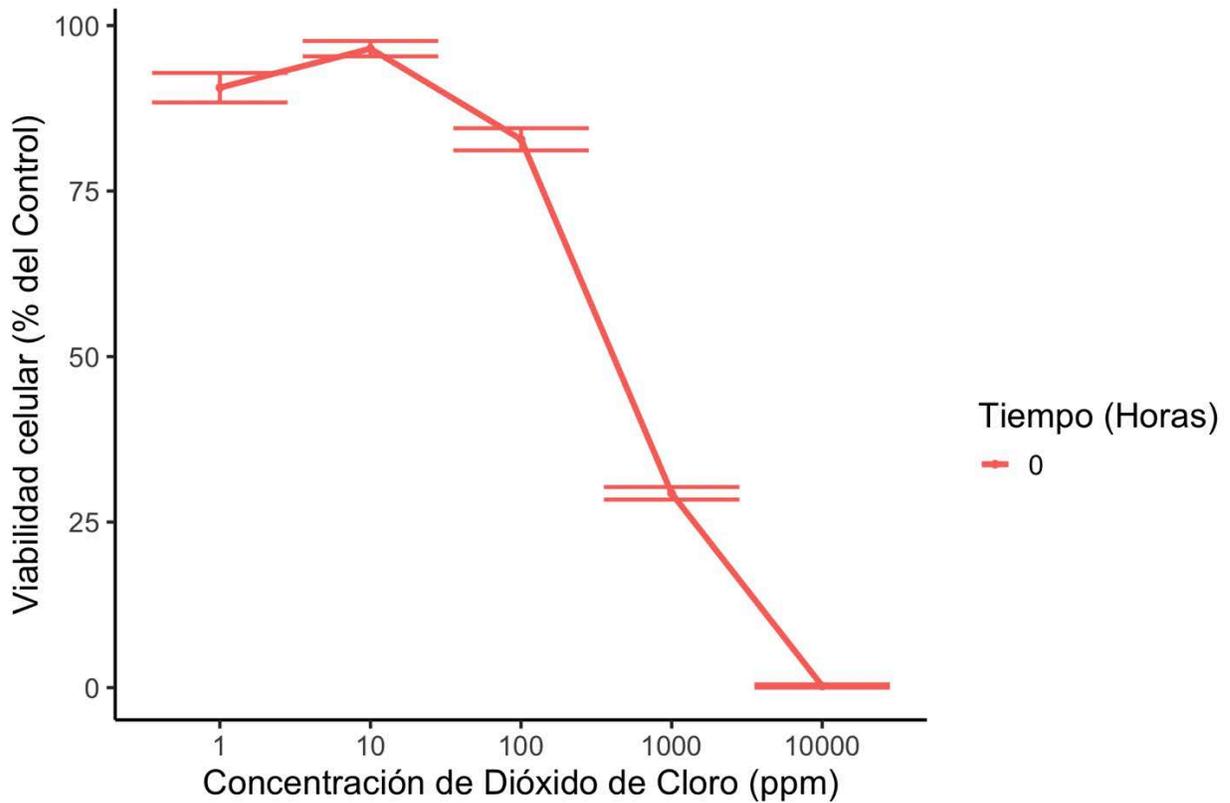


**Figura 53:** Efecto del dióxido de cloro a diferentes concentraciones (ppm) sobre la eficiencia fotosintética de *A. catenella* (AC), *K. selliformis* (KS) y *P. verruculosa* (PV) a diferentes tiempos de exposición (0 a 60 minutos).

Efecto del dióxido de cloro en la viabilidad de líneas celulares

Los resultados observados en la **figura 53** muestran que solo altas concentraciones de dióxido de cloro (1000 y 10000 ppm) pueden afectar severamente la eficiencia fotosintética de las microalgas objetivo de este estudio. Sin embargo, concentraciones de 1000 y 10000 ppm de dióxido de cloro son extremadamente tóxicas para organismos marinos (**Figura 53**). Esto se debe a que luego de exponer líneas branquiales RTgill-W1 por 2 horas a 1000 y 10000 ppm, su viabilidad baja significativamente alcanzado valores de 25% y 0% respectivamente (**Figura 54**). Adicionalmente, para llegar a concentraciones de 1000 y 10000 ppm de dióxido de cloro se necesitan volúmenes muy altos, los que en condiciones reales serían inmanejables. Así, se considera que el uso de esas concentraciones de

dióxido de cloro sería inviable como agente mitigador de FANs.



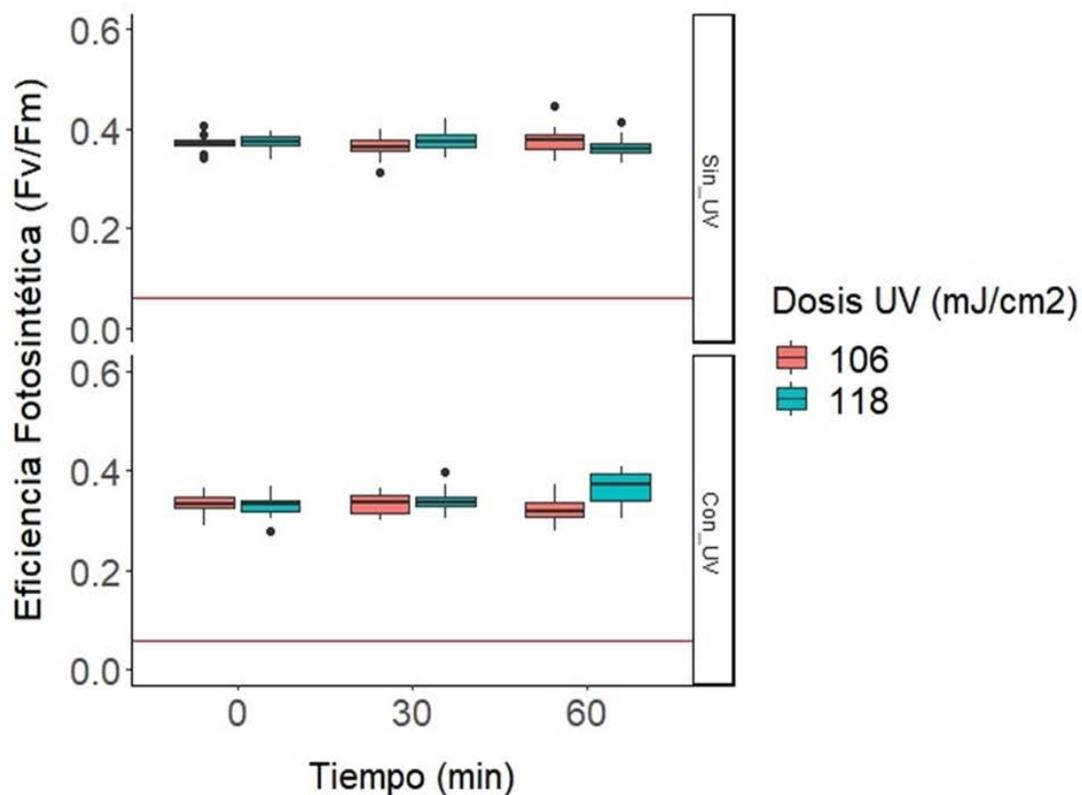
**Figura 54.** Efecto del dióxido de cloro sobre la viabilidad celular de líneas branquiales (RTgill-W1) luego de ser expuestas por dos horas a distintas concentraciones (de 1 a 10000 ppm).

### 9.2.2.3 Sistema Ultravioleta (UV) y wellboats

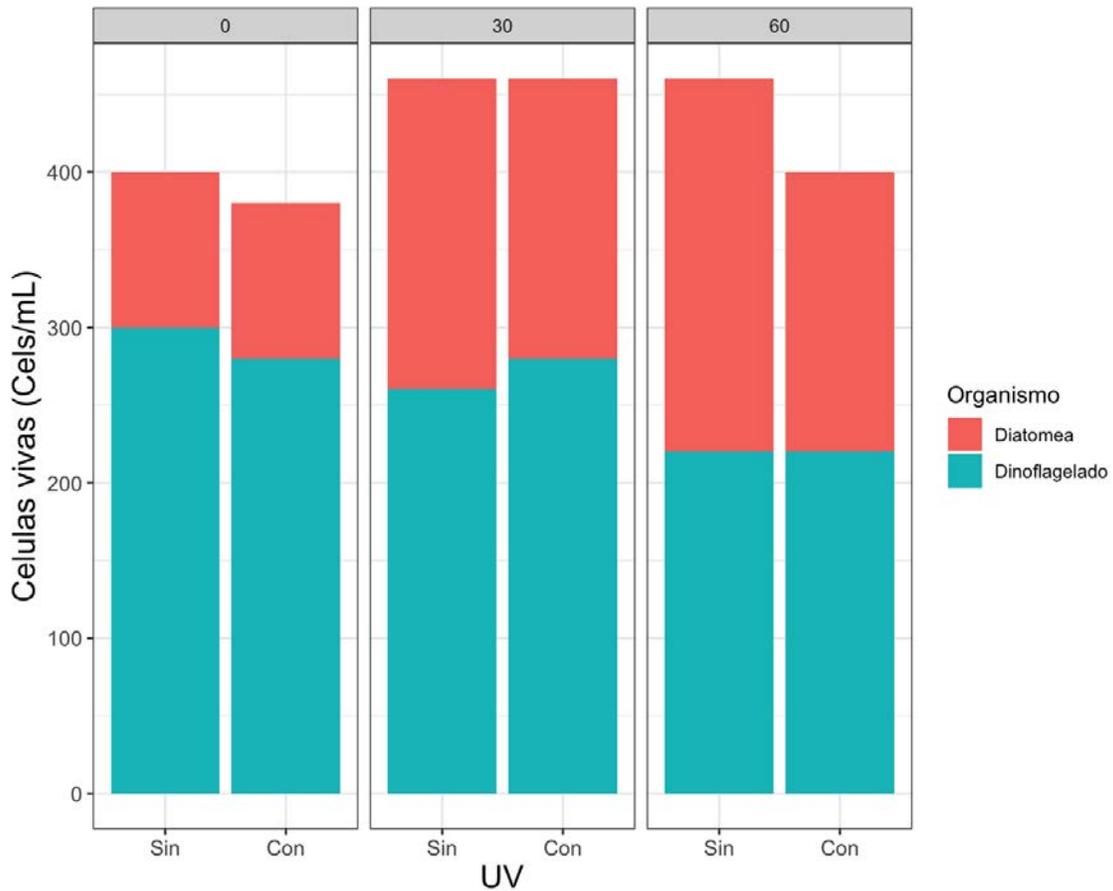
Experimento UV con la dosis utilizada en la embarcación:

Luego de aplicar las dosis de UV de 106 mJ/cm<sup>2</sup> y 118 mJ/cm<sup>2</sup> a la comunidad fitoplactónica, y mantener las muestras por 30 y 60 minutos en estanques, se observó una leve disminución de la eficiencia fotosintética (**Figura 55**). Además, la viabilidad celular no se vio afectada mostrando similares valores de células vivas antes y después de aplicar

una dosis de 106 mJ/cm<sup>2</sup>. Los valores de viabilidad celular fueron similares aun cuando se midieron luego de 30 y 60 minutos luego de aplicado el tratamiento (**Figuras 56**).



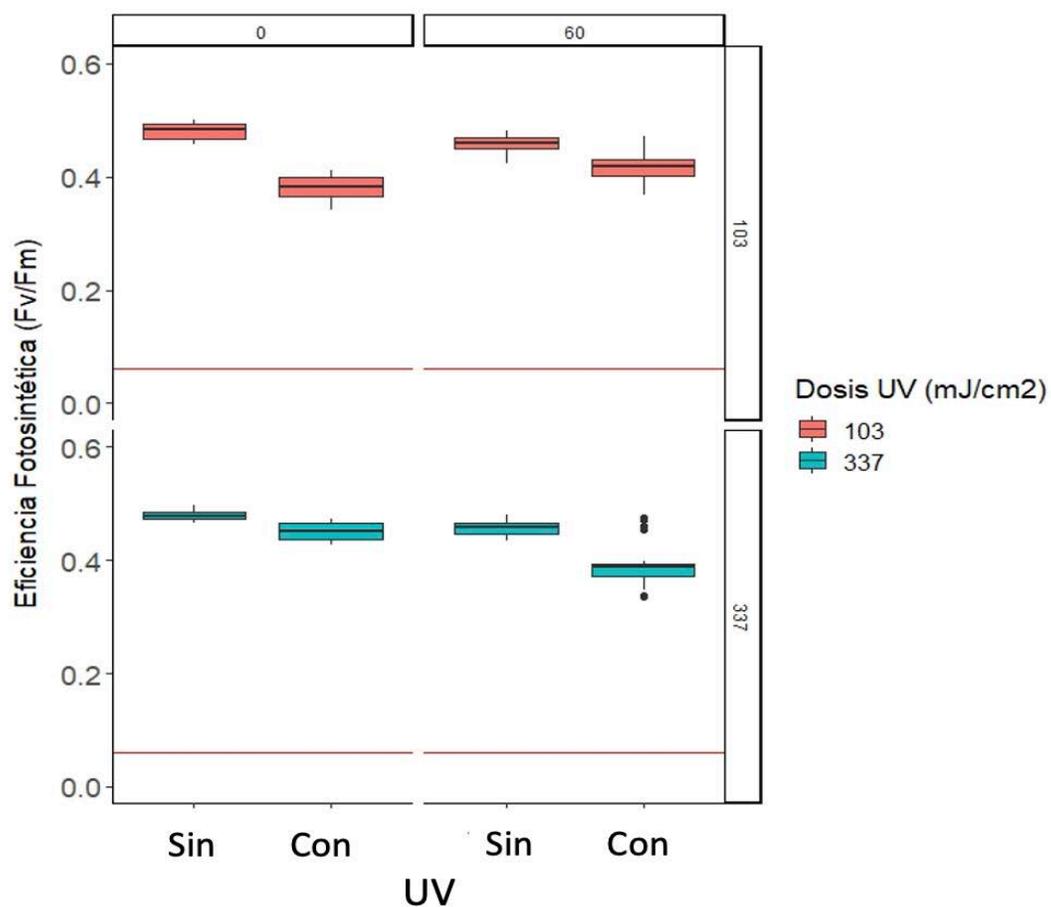
**Figura 55:** Efecto en la eficiencia fotosintética al aplicar dosis de UV en dos tubos de salida (106 y 118 mJ/cm<sup>2</sup>) a lo largo del tiempo. Sin\_UV se obtuvo la muestra antes de la lampara de UV y Con\_UV se obtuvo posterior a la lampara.



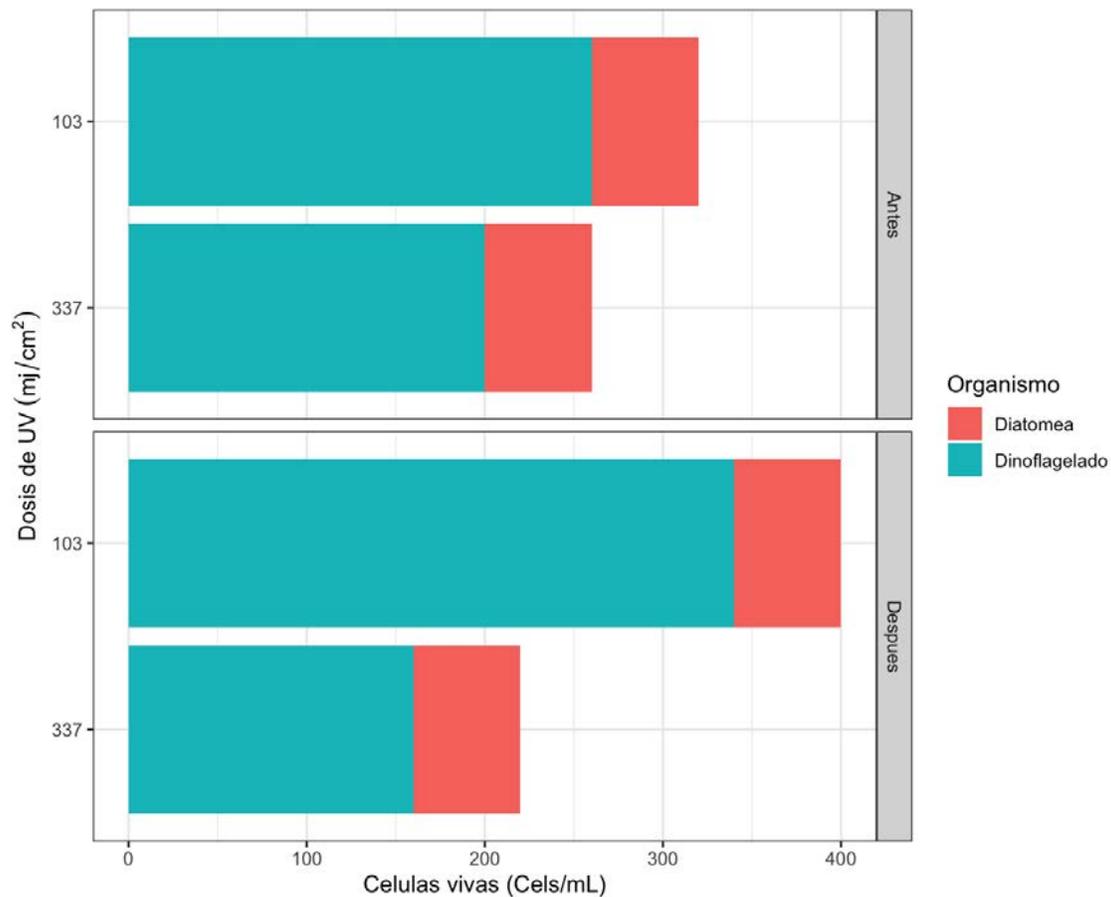
**Figura 56:** Efecto en la viabilidad celular al aplicar dosis de UV en un tubo de salida ( $106 \text{ mJ/cm}^2$ ) a lo largo del tiempo. Sin UV se obtuvo la muestra antes de la lampara de UV y Con\_UV se obtuvo posterior a la lampara.

Experimento UV con la dosis baja y dosis alta:

En el segundo experimento se utilizó una intensidad baja ( $103 \text{ mJ/cm}^2$ ) y un alta ( $337 \text{ mJ/cm}^2$ ) para mitigar a la comunidad fitoplanctónica. No obstante, aunque se incrementó la dosis de UV a  $337 \text{ mJ/cm}^2$ , los valores de eficiencia fotosintética fueron similares antes del tratamiento y luego del tratamiento (**Figura 57**). Además, estos valores no cambiaron sustantivamente luego de medir la eficiencia fotosintética después de 60 minutos. Por su parte, los valores de viabilidad celular mostraron una leve disminución luego de aplicados los tratamientos (**Figuras 58**).



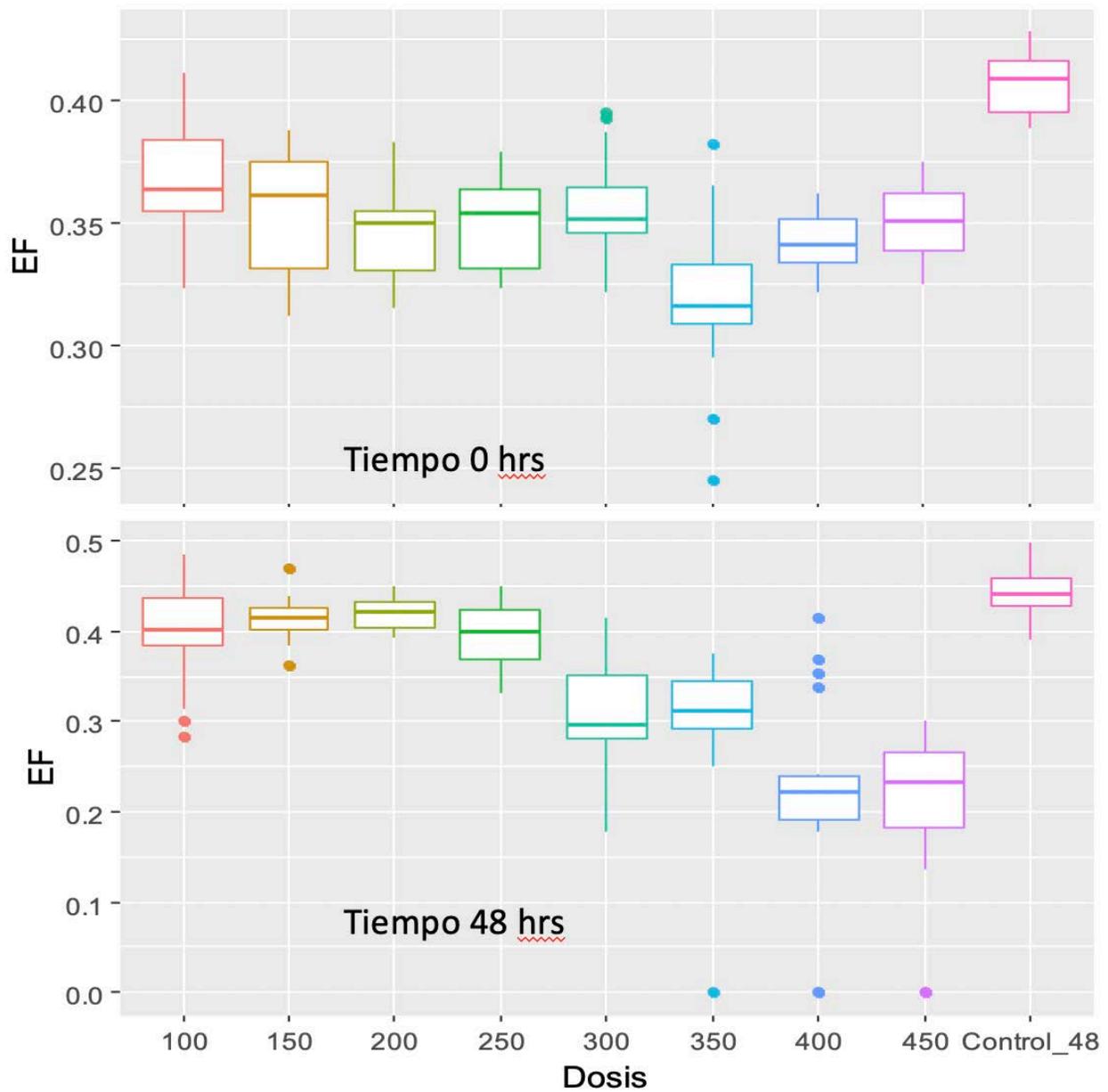
**Figura 57:** Efecto en la eficiencia fotosintética al aplicar dosis de UV baja (103 mJ/cm<sup>2</sup>) y dosis de UV alta (337 mJ/cm<sup>2</sup>) a lo largo del tiempo. Sin UV se obtuvo la muestra antes de la lampara de UV y Con UV se obtuvo posterior a la lampara.



**Figura 58:** Efecto en la viabilidad celular al aplicar dosis de UV baja (103 mJ/cm<sup>2</sup>) y dosis de UV alta (337 mJ/cm<sup>2</sup>). “Antes” se obtuvo la muestra previo a la lámpara de UV y “Después” se obtuvo posterior a la lámpara.

Experimento de aumento de dosis de UV a lo largo del tiempo:

En el último experimento se realizó un incremento progresivo de la dosis de UV desde 100 hasta 450 mJ/cm<sup>2</sup>. Los resultados mostraron una leve tendencia a disminuir la eficiencia fotosintética a medida que se incrementó la dosis de UV. Esta tendencia fue un poco más evidente después 48 horas cuando se realizó una nueva medición de las muestras previamente tratadas con distintas dosis. **(Figura 59)**



**Figura 59:** Efecto en la eficiencia fotosintética en la comunidad fitoplanctónica luego de incrementar las dosis de UV desde 100 hasta 450  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ . Línea amarilla medición luego de aplicar la dosis y línea verde después de 48 horas.



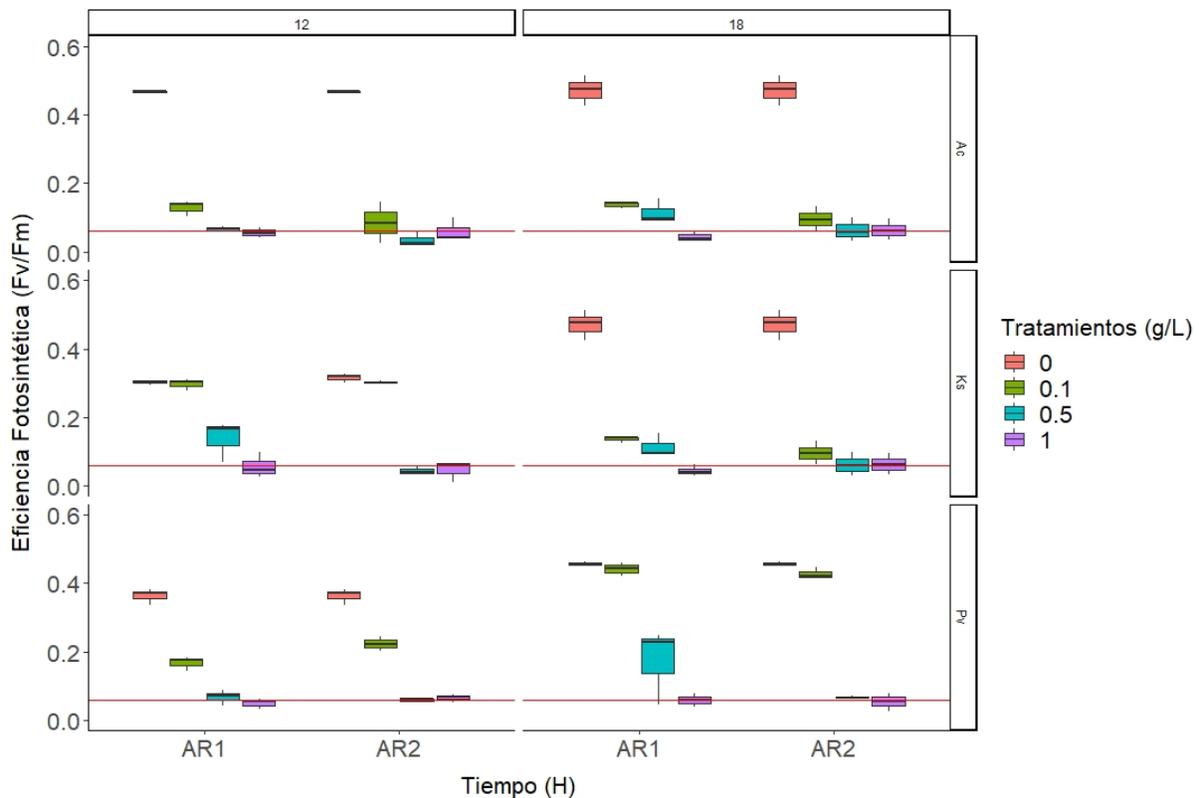
### 9.2.3 Métodos de mitigación para sistemas naturales (abiertos).

#### 9.2.3.1. Arcillas modificadas

##### 1) Experimentos con monocultivos

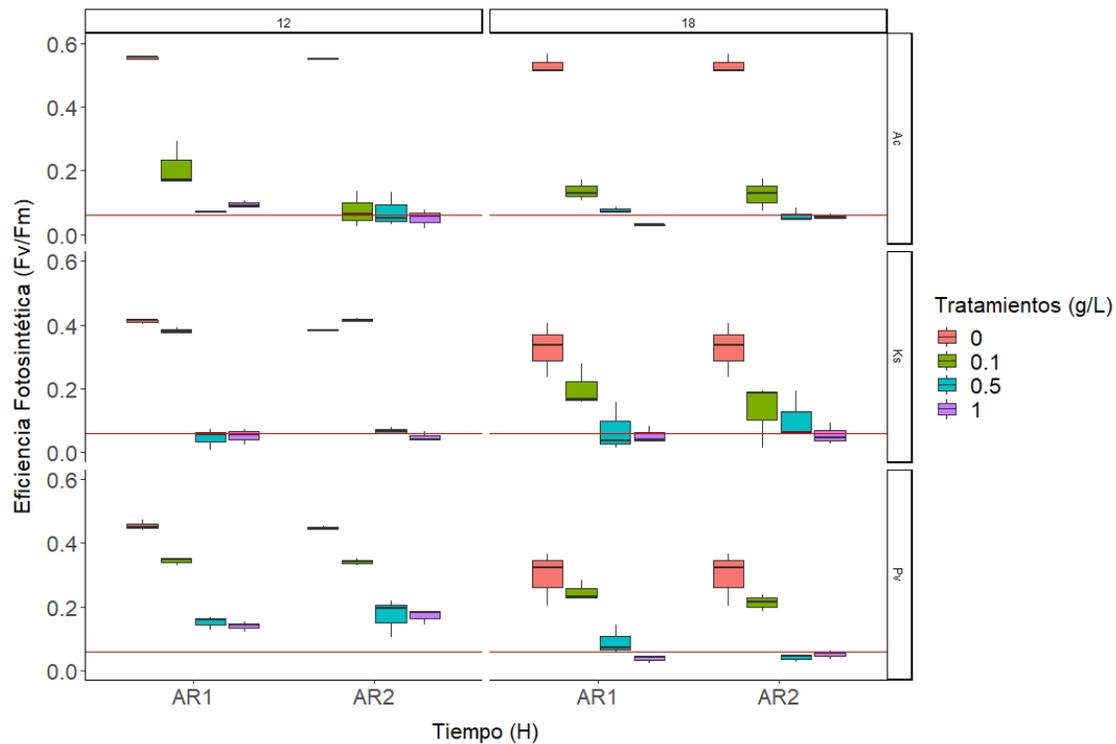
#### Efecto de las arcillas modificadas en la respuesta fotosintética de *A. catenella*, *K. selliformis* y *P. verruculosa*.

*A. catenella* (Ac) en el experimento de mitigación a 25 psu con arcillas modificadas (AR1 y AR2) a distintas concentraciones (0; 0,1; 0,5 y 1 g/L), se evidenció una disminución de la EF para cada concentración. Al incrementar las concentraciones de arcilla disminuyó la EF de Ac en ambas temperaturas (**Figura 60**). En el caso de *K. selliformis* (Ks) se evidenció una disminución paulatina de la EF en cada tratamiento de arcilla en ambas temperaturas, exceptuando el tratamiento 0,1 g/L a 12 °C que la EF fue similar al control. (**Figura 60**). En los experimentos de *P. verruculosa* (Pv) se observó la reducción de la EF como respuesta de la interacción celular con cada uno de los tratamientos (**Figura 60**). Sin embargo, en el tratamiento 0,1 g/L a 18 °C se observó que la EF era similar al control.



**Figura 60:** Eficiencia fotosintética de *A. catenella* (*Ac*), *K. selliformis* (*Ks*) y *P. verruculosa* (*Pv*) (1000 céls/mL) tratadas con dos tipos de arcillas modificadas a 25 psu y 12 y 18°C.

EL experimento de mitigación con arcillas modificadas a 33 psu a 12 y 18 °C con distintas concentraciones experimentales (control; 0,1; 0,5 y 1 g/L), se observó que los efecto de las arcillas AR1 y AR2 sobre las células, reducen la EF en todas concentraciones testeadas en *A. catenella* (**Figura 61**). En el caso de *K. selliformis* (*Ks*), los efecto de las arcillas modificadas (AR1 y AR2), sobre las células se observa un patrón similar en la reducción de EF a medida que aumentan las concentraciones experimentales, exceptuando el tratamiento 0,1 g/L a 12 °C que la EF fue similar al control (**Figura 61**). Para *P. verruculosa* (*Pv*), para ambos experimentos se evidencia una disminución EF dentro del sistema de cultivo (**Figura 61**). Se observa que en todos tratamientos con distintas especies se genera una captura y transporte de las microalgas hacia el fondo del matraz o generan un efecto letal sobre las células, evidenciando una disminución de la EF para cada tratamiento.

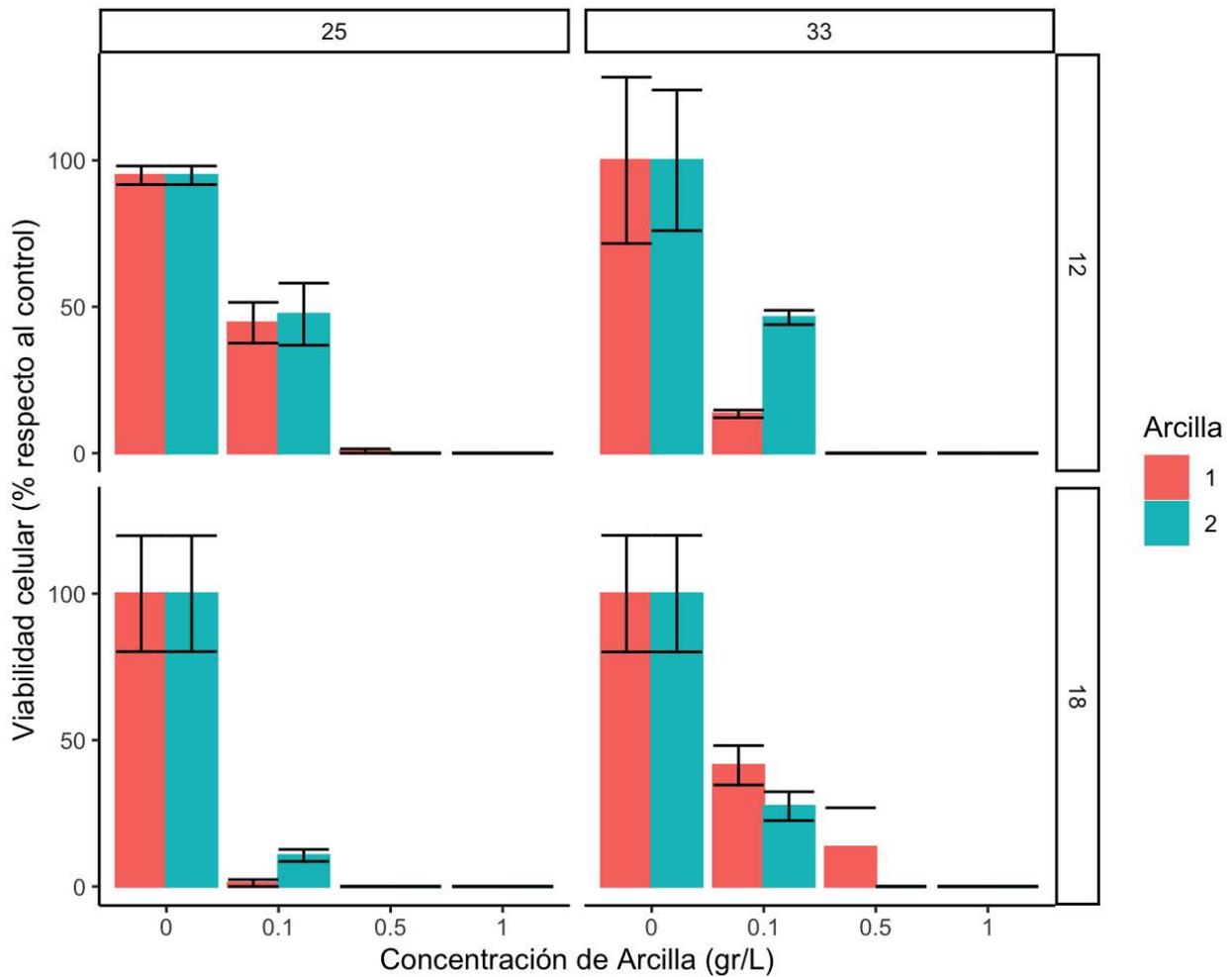


**Figura 61:** Eficiencia fotosintética de *A. catenella* (Ac), *K. selliformis* (Ks) y *P. verruculosa* (Pv) (1000 céls/mL) tratadas con dos tipos de arcillas modificadas a 33 psu y 12 y 18°C.

Efecto de las arcillas modificadas en la viabilidad celular de *A. catenella* (Ac), *K. selliformis* (Ks) y *P. verruculosa* (Pv).

La evaluación de la viabilidad celular de *Karenia selliformis* utilizando una densidad de 1000 céls/mL y al ser expuesta a dos tipos de arcilla (1 y 2) en concentraciones de 0,5 y 1 g/L, por 2 horas, y en condiciones experimentales de 12°C temperatura, 25 y 33 PSU salinidad, mostró que la viabilidad celular fue afectada severamente obteniéndose valores cercanos a 0%. En tanto que, en las mismas condiciones experimentales, pero utilizando una concentración de 0,1 g/L, se observaron valores más altos de viabilidad en un rango entre 10% y 50% (**Figura 62**). Similarmente, cuando se aumentó la temperatura a 18°C y se expusieron las células a concentraciones de 0,5 y 1 g/L de las arcillas 1 y 2 (manteniendo las condiciones experimentales de exposición por 2 horas, 12°C, salinidades de 25 y 33) se observó que la viabilidad bajo a 0%. No obstante, al utilizar una

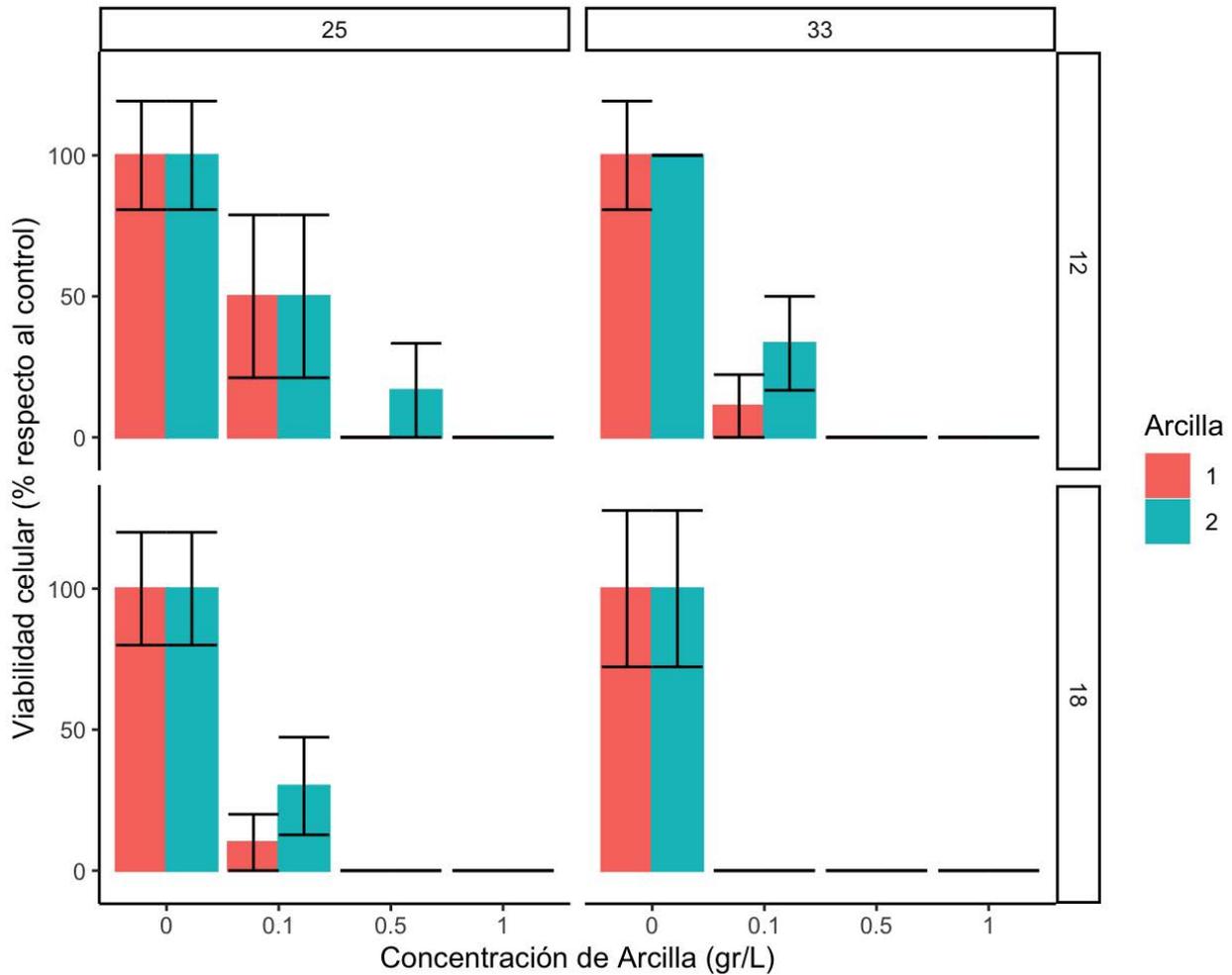
concentración de 0,1 g/L la viabilidad mostro valores en un rango entre 5% y 45% (**Figura 62**).



**Figura 62.** Porcentaje de la viabilidad celular de *K. selliformis* (1000 céls/mL) luego de ser expuestas a diferentes concentraciones de arcillas modificadas por 120 minutos y a diferentes condiciones experimentales de temperatura (12° y 18° C) y salinidad (25 y 33). En rojo la arcilla 1 y en azul la arcilla 2.

La evaluación de la viabilidad celular de *P. verruculosa* (1000 cel/mL) al ser expuesta a

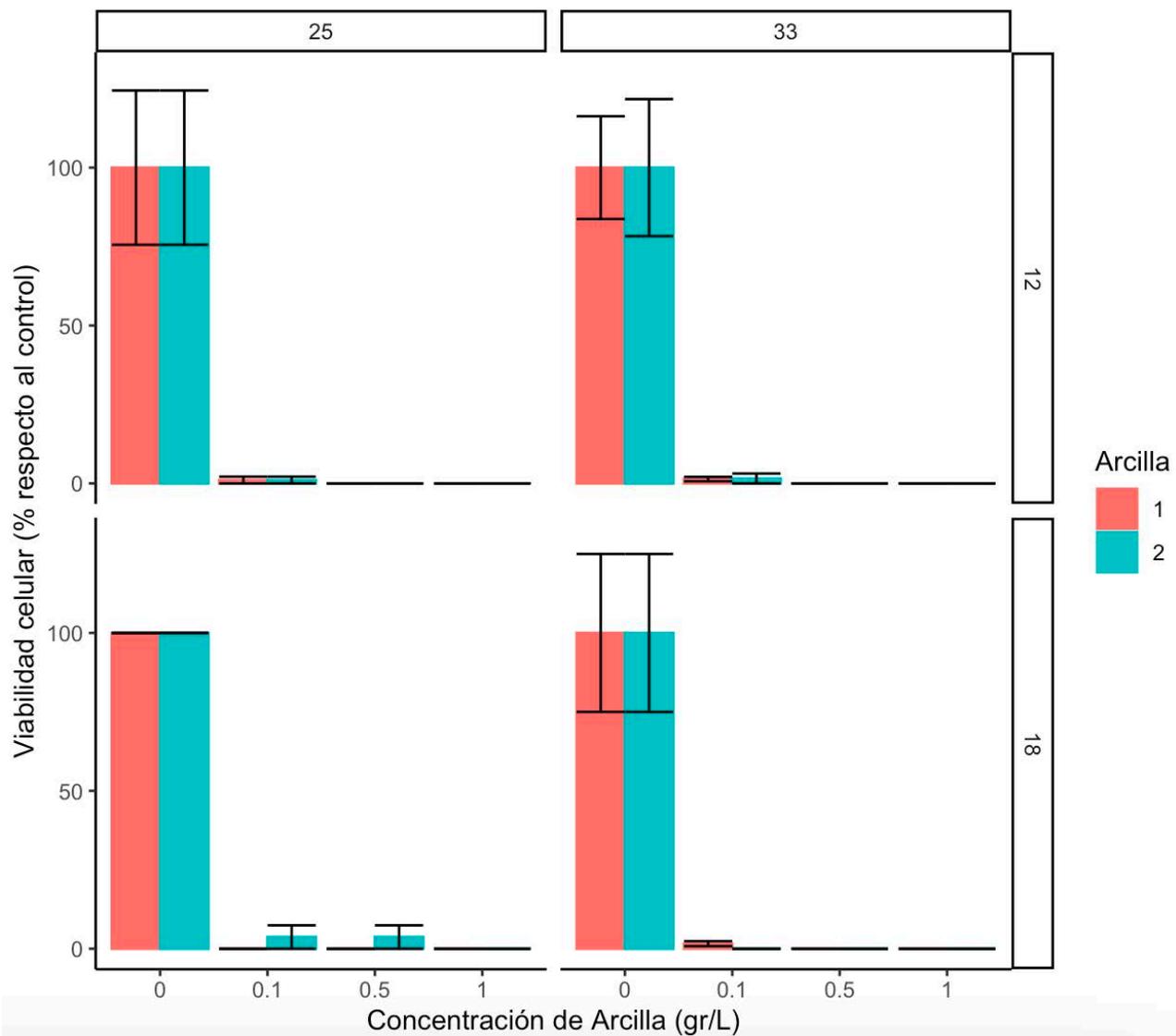
dos tipos de arcilla (1 y 2) en concentraciones de 0,5 y 1 g/L, por 2 horas, y en condiciones experimentales de 12°C temperatura, 25 y 33 de salinidad, mostró que la viabilidad fue afectada registrándose valores en su mayoría de 0%. La excepción fue cuando se usó la arcilla 2 a una concentración de 0,5 g/L donde se observó una viabilidad de 15%. En tanto que, en las mismas condiciones experimentales, pero utilizando una concentración de 0,1 g/L, se observaron valores más altos de viabilidad en un rango entre 10% y 45% (**Figura 63**). Cuando la temperatura fue aumentada a 18°C y se mantuvieron las condiciones experimentales descritas anteriormente (exposición por 2 horas, 12°C, salinidades de 25 y 33 PSU) se observó que la viabilidad bajo a 0% en concentraciones de 0,5 y 1 g/L. Al utilizar una concentración de 0,1 g/L la viabilidad fue mayor a 25 psu que a 30 psu donde se observaron valores de aproximadamente de 25% y 0% respectivamente (**Figura 63**).



**Figura 63:** Porcentaje de la viabilidad celular de *P. verruculosa* (1000 céls/mL) luego de ser expuestas a diferentes concentraciones de arcillas modificadas por 120 minutos y a diferentes condiciones experimentales de temperatura (12° y 18° C) y salinidad (25 y 33). En rojo la arcilla 1 y en azul la arcilla 2.

La evaluación de la viabilidad celular de *Alexandrium catenella* (1000 cel/mL) al ser expuesta a dos tipos de arcilla (1 y 2) en concentraciones de 0,1, 0,5 y 1 g/L, por 2 horas, y en condiciones experimentales de 12°C temperatura, 25 y 33 de salinidad, mostró que fue afectada severamente registrándose valores de 0%. Similarmente, cuando la temperatura aumentó a 18°C y se mantuvieron las condiciones experimentales descritas

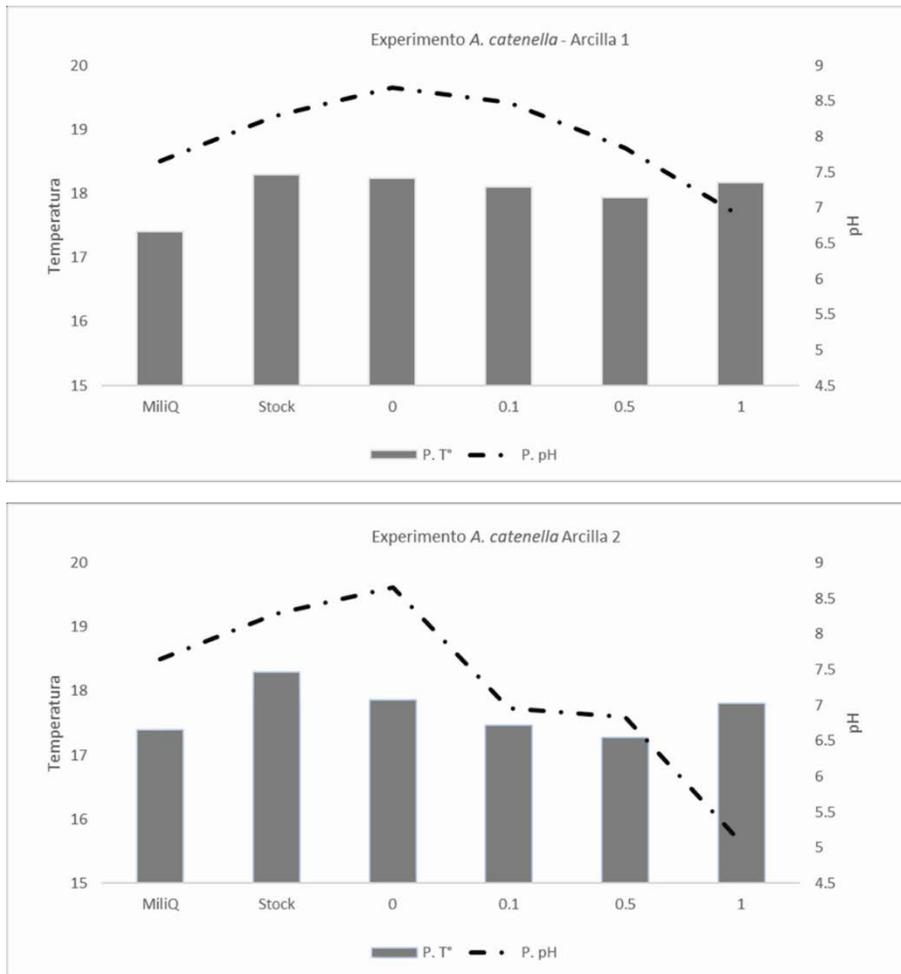
anteriormente (exposición por 2 horas, 12°C, salinidades de 25 y 33) se observó que la viabilidad bajo a 0% en concentraciones de 0,1, 0,5 y 1 g/L (**Figura 64**).



**Figura 64:** Porcentaje de la viabilidad celular de *A. catenella* (1000 céls/mL) luego de ser expuestas a diferentes concentraciones de arcillas modificadas por 120 minutos y a diferentes condiciones experimentales de temperatura (12° y 18° C) y salinidad (25 y 33). En rojo la arcilla 1 y en azul la arcilla 2.

Efecto de las arcillas modificadas en el pH

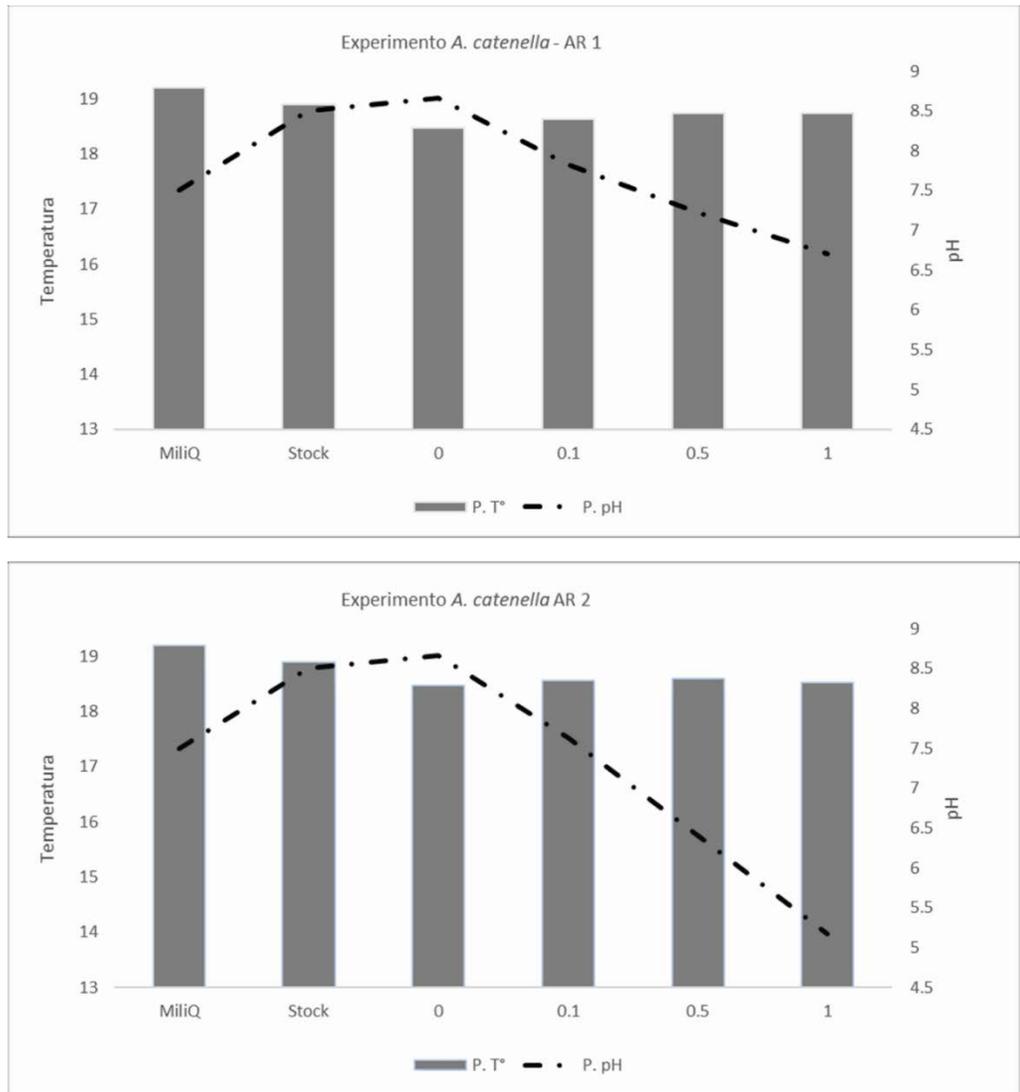
Al finalizar el periodo experimental de *A. catenella* (1000 céls/mL) expuesta a dos tipos de arcillas modificadas a 25 de salinidad y 12 °C. Se midió pH y temperatura en cada tratamiento. Los valores de muestran que, al incrementar las concentraciones de arcilla disminuye el pH. La arcilla tipo 2 una capacidad para reducir del pH, lo cual influye directamente en la EF de la microalga (**Figura 65**).



**Figura 65:** Medición de temperatura y pH post-experimentos de *A. catenella* (1000 céls/mL) durante la exposición a dos tipos de arcillas modificadas a 25 de salinidad y a temperatura 12 °C.

Al finalizar el periodo experimental de *A. catenella* (1000 céls/mL) expuesta a dos tipos de arcillas modificadas a 33 de salinidad y 12 °C. Se midió pH y temperatura en cada tratamiento. Los valores de muestran que, al incrementar las concentraciones de arcilla

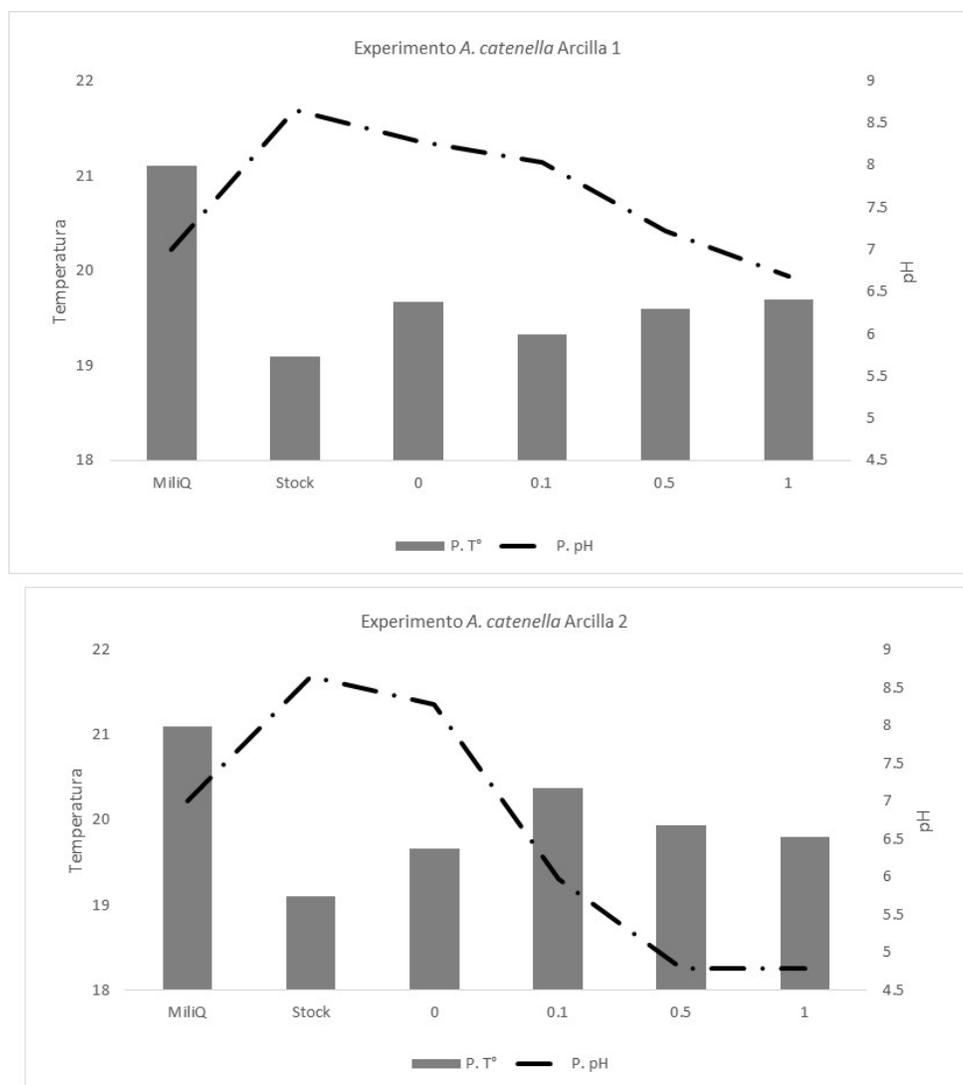
disminuye el pH. La arcilla tipo 2, presenta una capacidad para reducir del pH ( $\geq 5.0$ ), lo cual influye directamente en la EF de la microalga. Esta característica podría considerarse como un cofactor anexo al ya conocido efecto floculante en las microalgas (**Figura 66**).



**Figura 66:** Medición de temperatura y pH post-experimentos *A. catenella* (1000 céls/mL) durante la exposición a dos tipos de arcillas modificadas a 33 de salinidad y 12 °C.

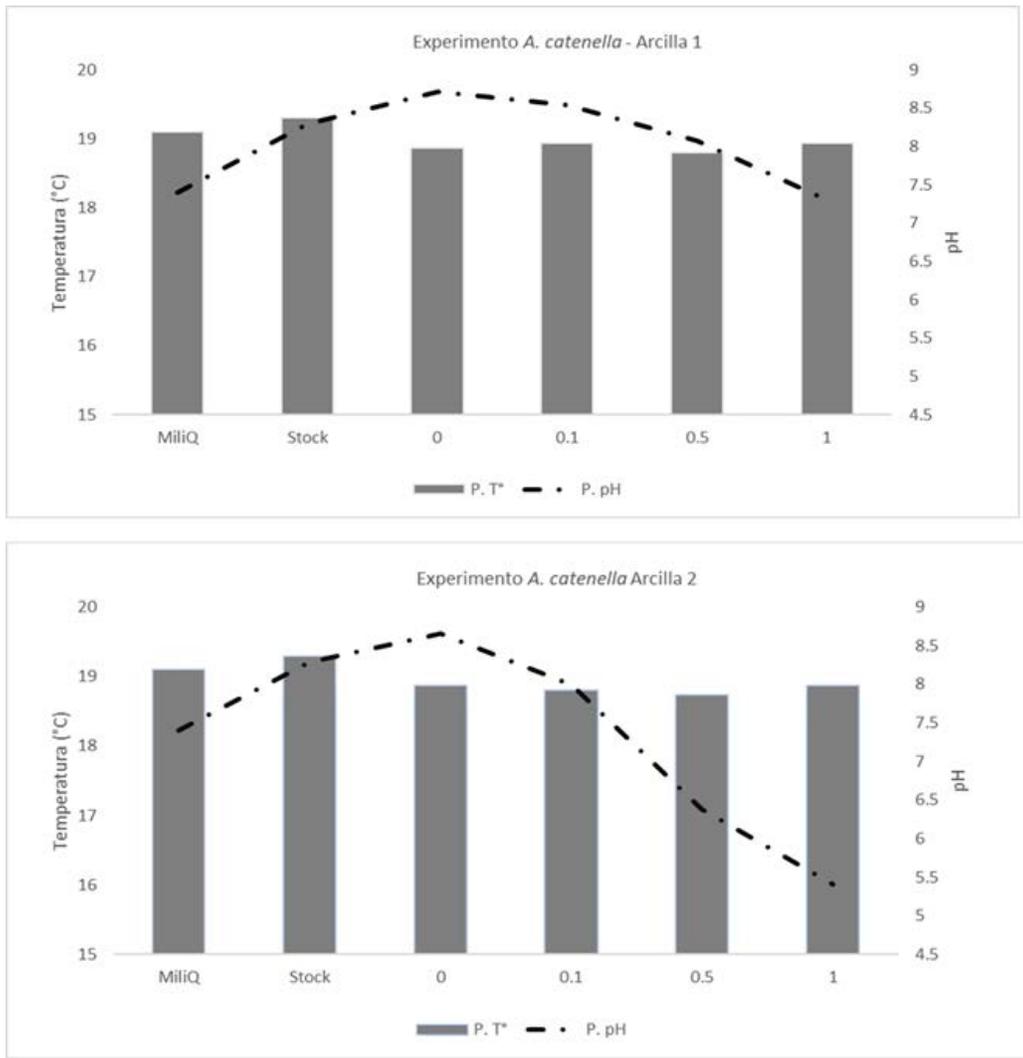
Al finalizar el periodo experimental de *A. catenella* (1000 céls/mL) expuesta a dos tipos de arcillas modificadas a 25 de salinidad y 18 °C. Se midió pH y temperatura en cada

tratamiento. Los valores de muestran que, al incrementar las concentraciones de ambas arcilla disminuye el pH. La arcilla tipo 2, presenta un pH más bajo ( $\geq 5.5$ ). Lo cual influye directamente en la EF de la microalga. Lo que presenta una estrecha relación con la disminución de la EF de *A. catenella* al ser estimada con el FRRf (**Figura 67**).



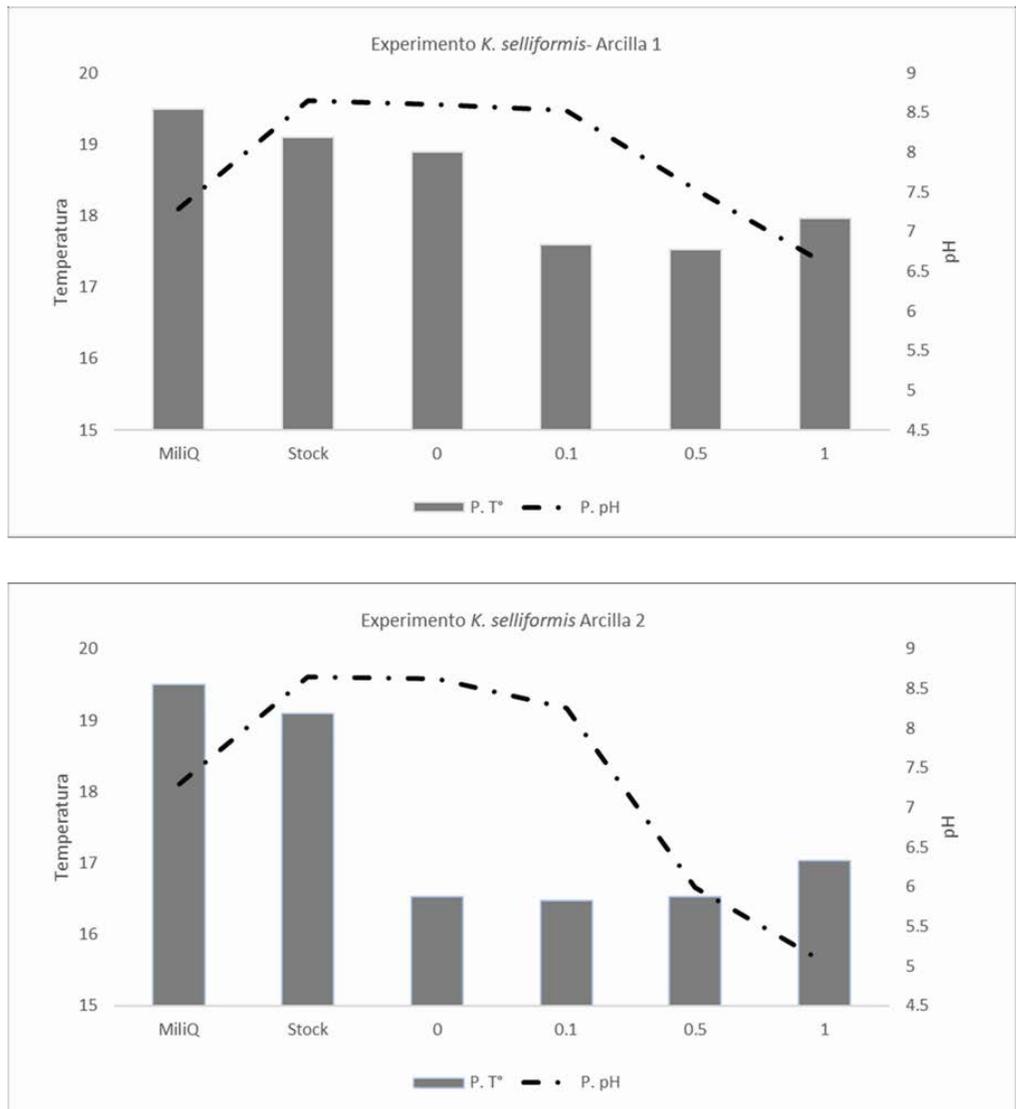
**Figura 67:** Medición de temperatura y pH post-experimentos *A. catenella* (1000 céls/mL) durante la exposición a dos tipos de arcillas modificadas a 33 de salinidad y 12 °C.

Al finalizar el periodo experimental de *A. catenella* (1000 céls/mL) expuesta a dos tipos de arcillas modificadas a 33 de salinidad y 18 °C. Se midió pH y temperatura en cada tratamiento. Los valores de muestran que, al incrementar las concentraciones de ambas arcilla disminuye el pH. La arcilla tipo 2, presenta un pH más bajo ( $\geq 5.5$ ). Lo cual influye directamente en la EF de la microalga. Lo que presenta una estrecha relación con la disminución de la EF de *A. catenella* al ser estimada con el FRRf (**Figura 68**).



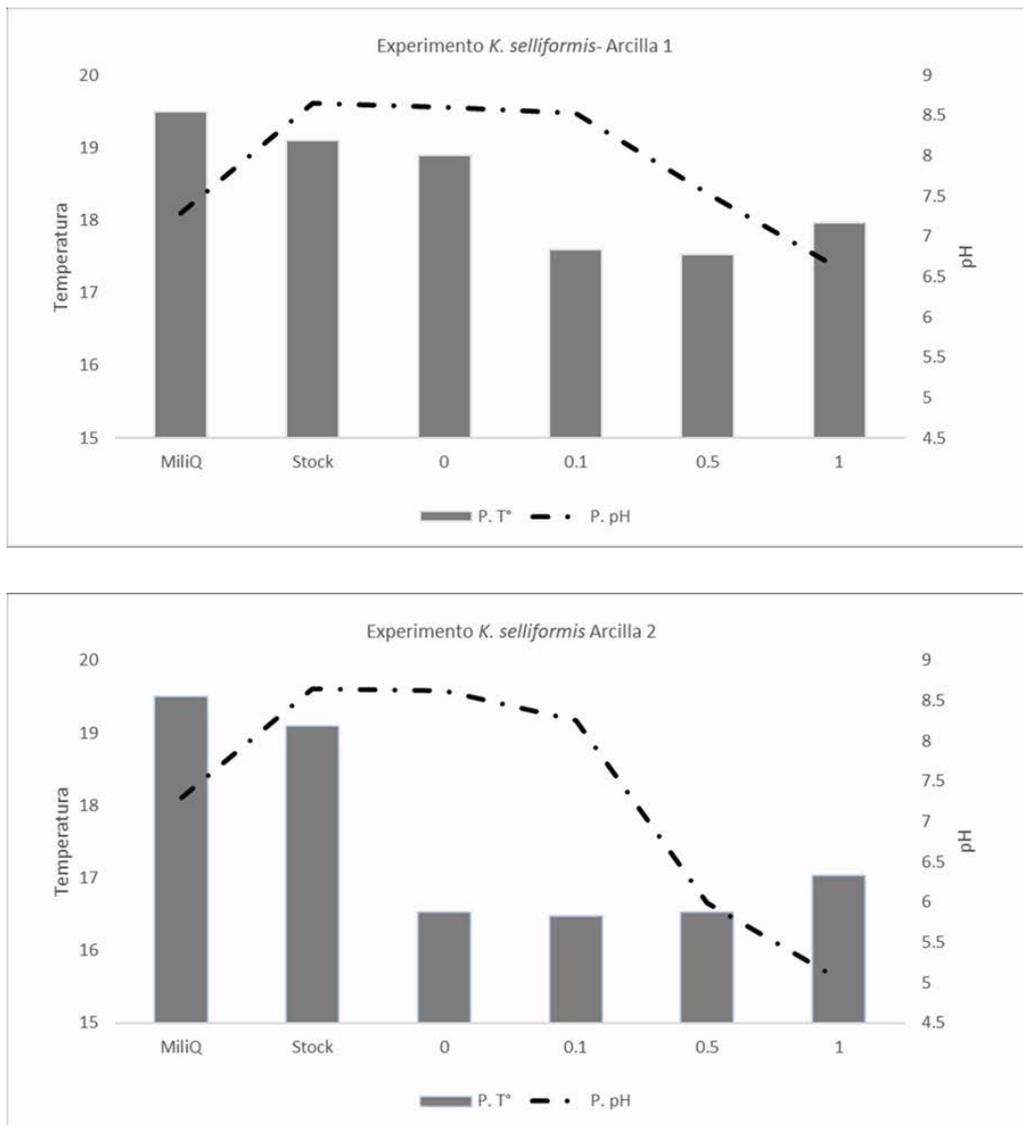
**Figura 68.** Medición de temperatura y pH post-experimentos *A. catenella* (1000 céls/mL) durante la exposición a dos tipos de arcillas modificadas a 33 de salinidad y 18 °C.

Al finalizar el periodo experimental de *K. selliformis* (1000 céls/mL) expuesta a dos tipos de arcillas modificadas a 25 de salinidad y 12 °C. Se midió pH y temperatura en cada tratamiento. Los valores muestran que, al incrementar las concentraciones de ambas arcilla disminuye el pH. La arcilla tipo 2, presenta un pH más bajo ( $\geq 5.0$ ). Lo cual influye directamente en la EF de la microalga. Lo que presenta una estrecha relación con la disminución de la EF de *K. selliformis* al ser estimada con el FRRf (**Figura 69**).



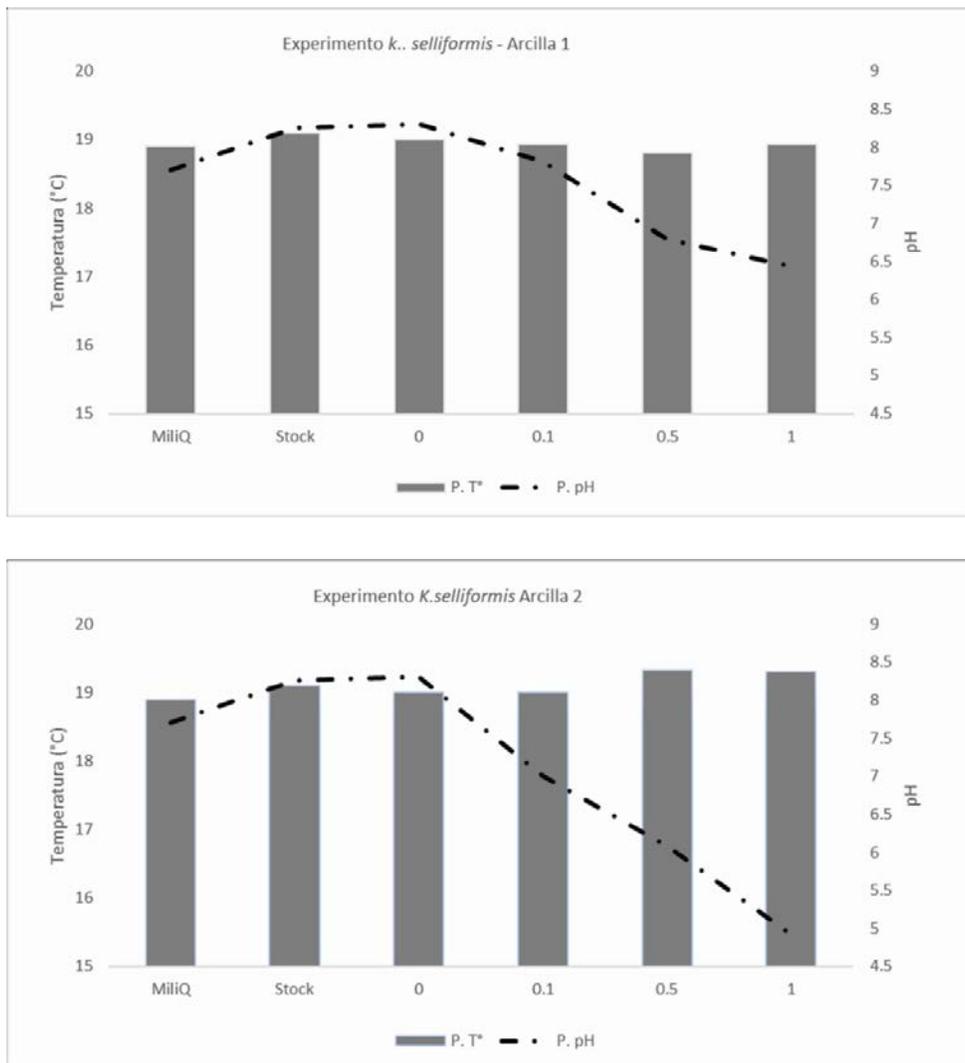
**Figura 69.** Medición de temperatura y pH post-experimentos de *K. selliformis* (1000 céls/mL) expuesta dos tipos de arcillas modificadas a 25 de salinidad y 12 °C.

Al finalizar el periodo experimental de *K. selliformis* (1000 céls/mL) expuesta a dos tipos de arcillas modificadas a 33 de salinidad y 12 °C. Se midió pH y temperatura en cada tratamiento. Los valores de muestran que, al incrementar las concentraciones de ambas arcilla disminuye el pH. La arcilla tipo 2, presenta un pH más bajo ( $\geq 4.8$ ). Lo cual influye directamente en la EF de la microalga. Lo que presenta una estrecha relación con la disminución de la EF de *K. selliformis* al ser estimada con el FRRf (**Figura 70**).



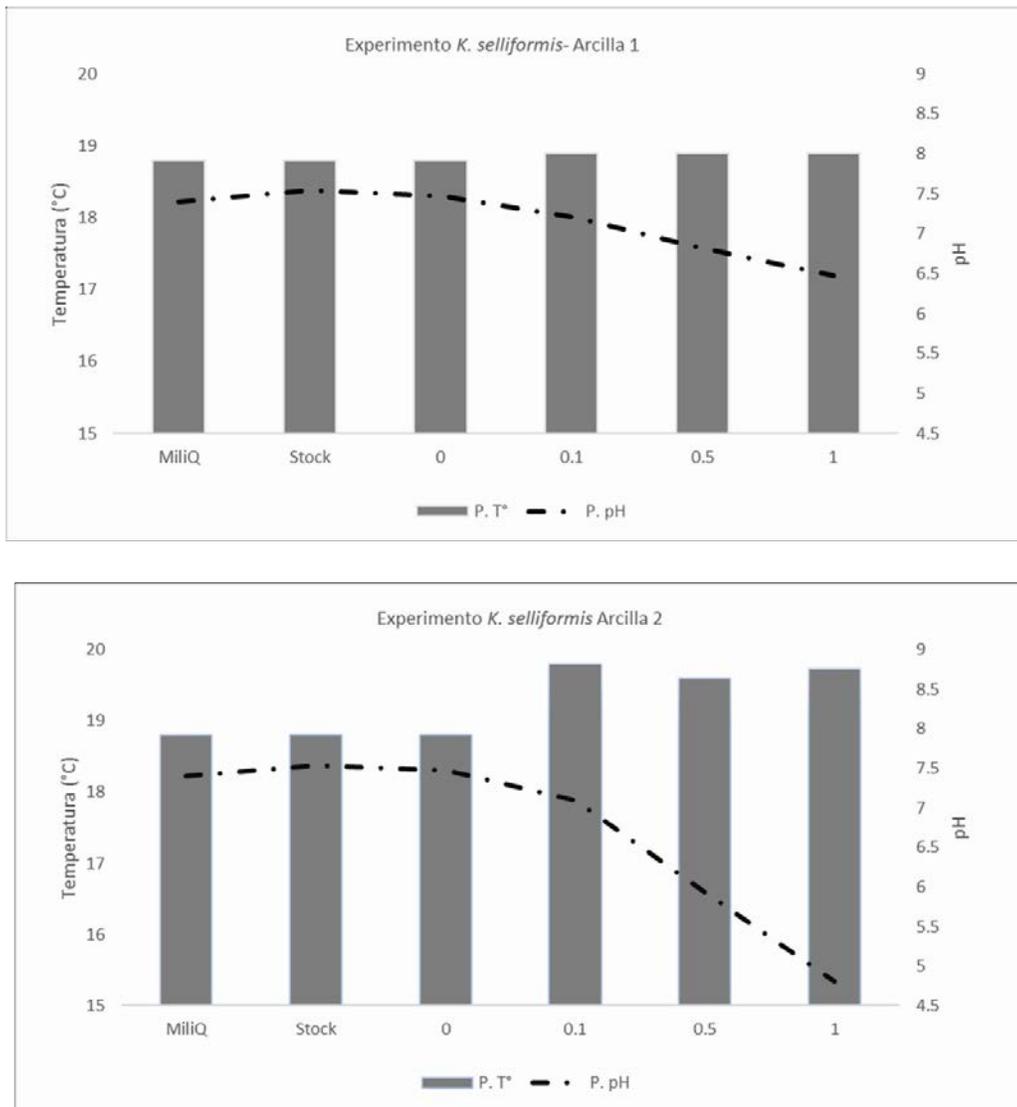
**Figura 70.** Medición de temperatura y pH post-experimentos de *K. selliformis* (1000 céls/mL) expuesta dos tipos de arcillas modificadas a 33 de salinidad y 12 °C.

Al finalizar el periodo experimental de *K. selliformis* (1000 céls/mL) expuesta a dos tipos de arcillas modificadas a 25 de salinidad y 18 °C. Se midió pH y temperatura en cada tratamiento. Los valores de muestran que, al incrementar las concentraciones de ambas arcilla disminuye el pH. La arcilla tipo 2, presenta un pH más bajo ( $\geq 4.8$ ). Lo cual influye directamente en la EF de la microalga. Lo que presenta una estrecha relación con la disminución de la EF de *K. selliformis* al ser estimada con el FRRf (**Figura 71**).



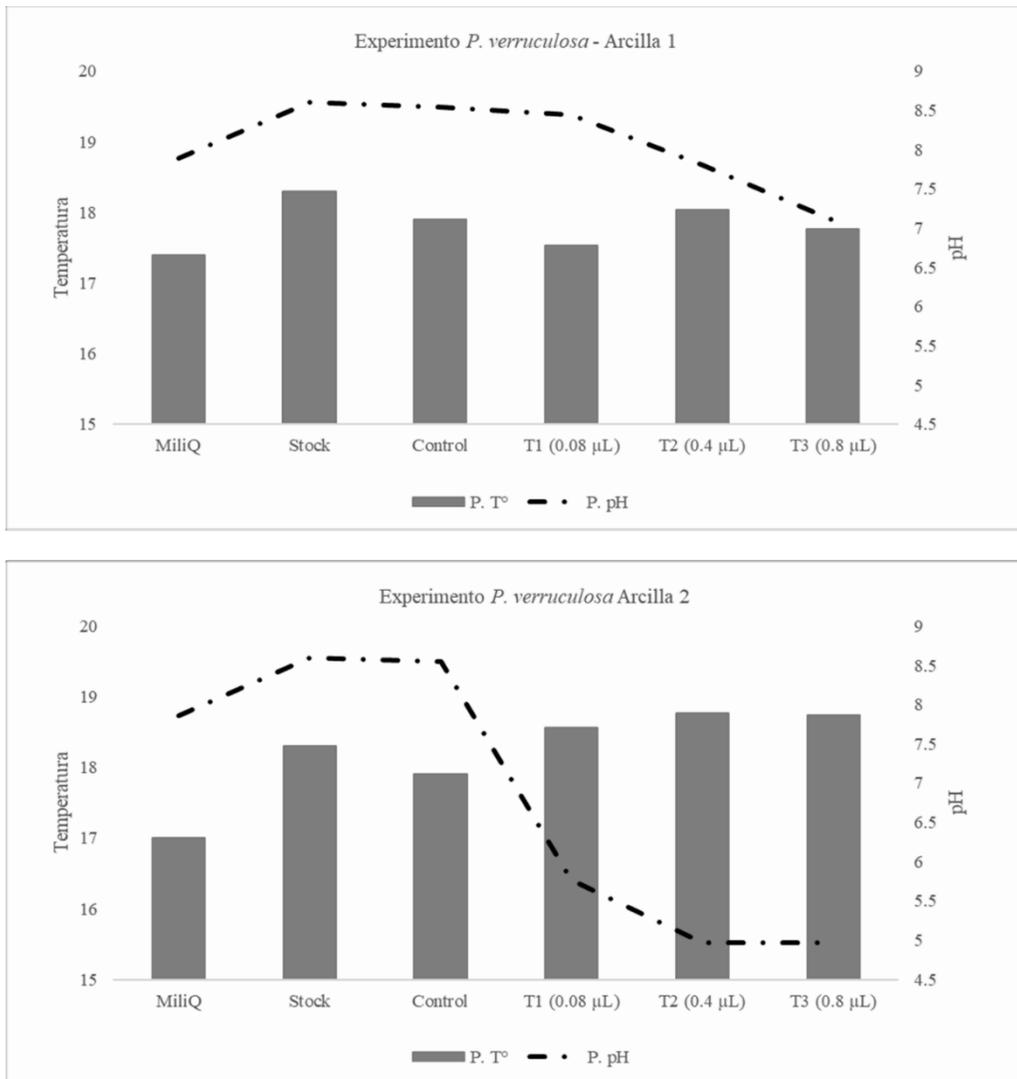
**Figura 71.** Medición de temperatura y pH post-experimentos de *K. selliformis* (1.000 céls/mL) expuesta dos tipos de arcillas modificadas a 25 de salinidad y 18 °C.

Al finalizar el periodo experimental de *K. selliformis* (1000 céls/mL) expuesta a dos tipos de arcillas modificadas a 33 de salinidad y 18 °C. Se midió pH y temperatura en cada tratamiento. Los valores de muestran que, al incrementar las concentraciones de ambas arcilla disminuye el pH. La arcilla tipo 2, presenta un pH más bajo ( $\geq 4.8$ ). Lo cual influye directamente en la EF de la microalga. Lo que presenta una estrecha relación con la disminución de la EF de *K. selliformis* al ser estimada con el FRRf (**Figura 72**).



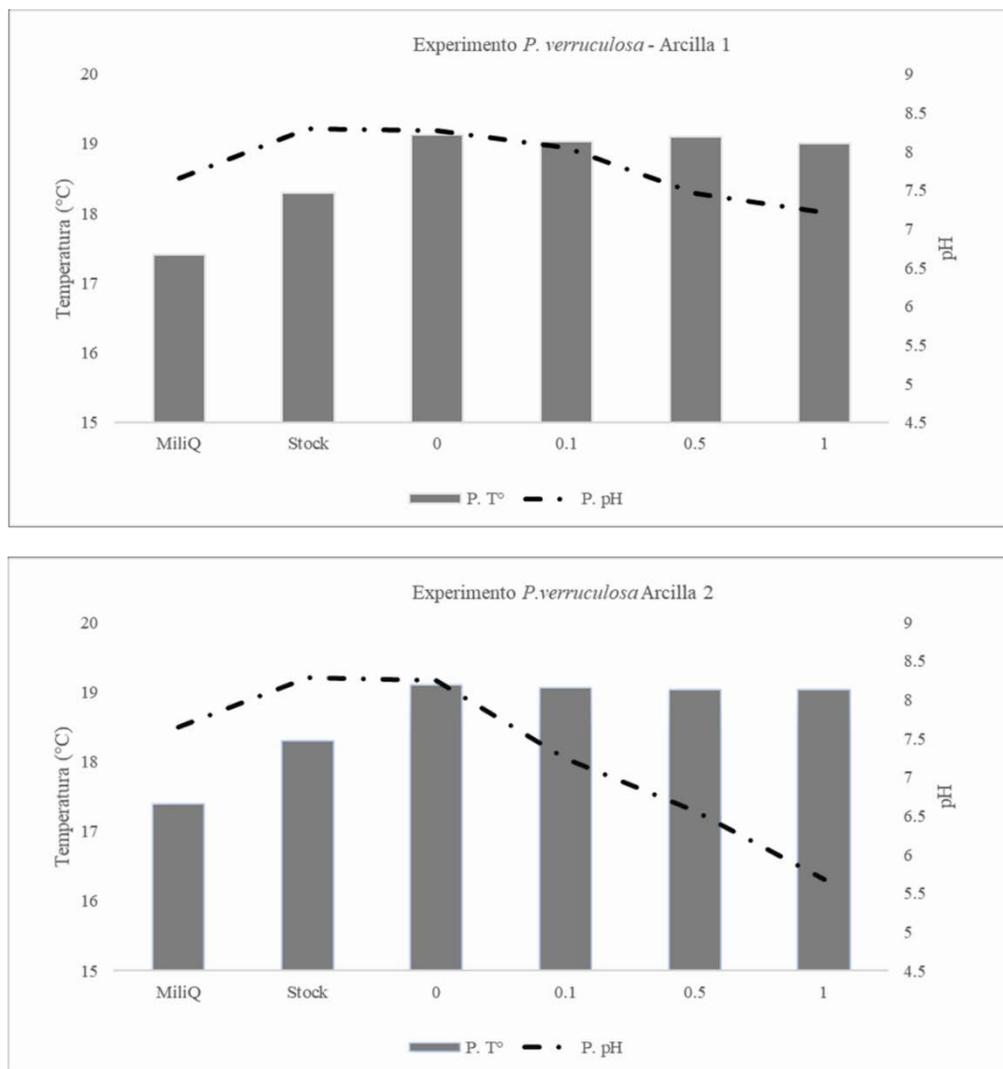
**Figura 72:** Medición de temperatura y pH post-experimentos de *K. selliformis* (1000 céls/mL) expuesta dos tipos de arcillas modificadas a 33 de salinidad y 18 °C.

Al finalizar el periodo experimental de *P. verruculosa* (1000 céls/mL) expuesta a dos tipos de arcillas modificadas a 25 de salinidad y 12 °C. Se midió pH y temperatura en cada tratamiento. Los valores de muestran que, al incrementar las concentraciones de ambas arcilla disminuye el pH. La arcilla tipo 2, presenta un pH más bajo ( $\geq 4.7$ ). Lo cual influye directamente en la EF de la microalga. Lo que presenta una estrecha relación con la disminución de la EF de *K. selliformis* al ser estimada con el FRRf (**Figura 73**).



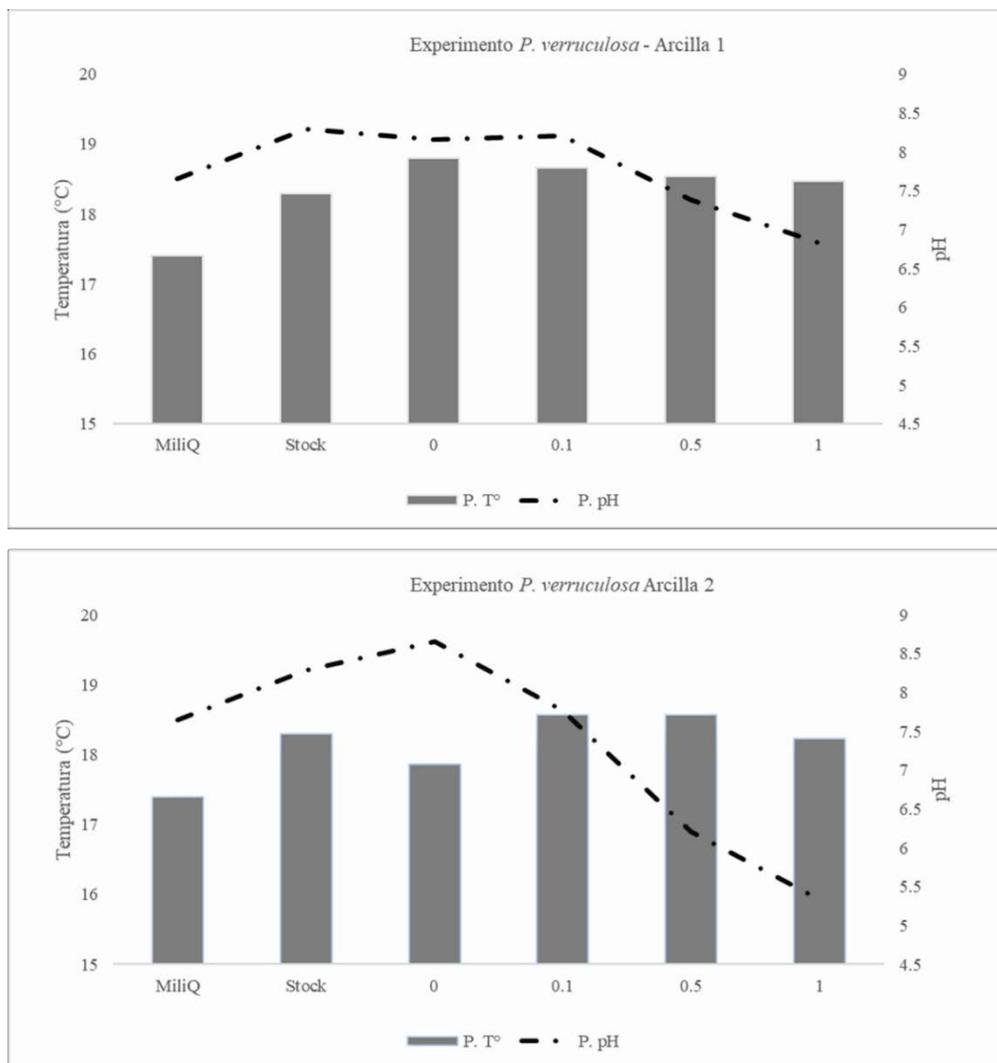
**Figura 73:** Medición de temperatura y pH post-experimentos de *P. verruculosa* (1000 céls/mL) expuesta dos tipos de arcillas modificadas a 25 de salinidad y a temperatura 12 °C.

Al finalizar el periodo experimental de *P. verruculosa* (1000 céls/mL) expuesta a dos tipos de arcillas modificadas a 25 de salinidad y 18 °C. Se midió pH y temperatura en cada tratamiento. Los valores de muestran que, al incrementar las concentraciones de ambas arcilla disminuye el pH. La arcilla tipo 2, presenta un pH más bajo ( $\geq 5.5$ ). Lo cual influye directamente en la EF de la microalga. Lo que presenta una estrecha relación con la disminución de la EF de *K. selliformis* al ser estimada con el FRRf (**Figura 74**).



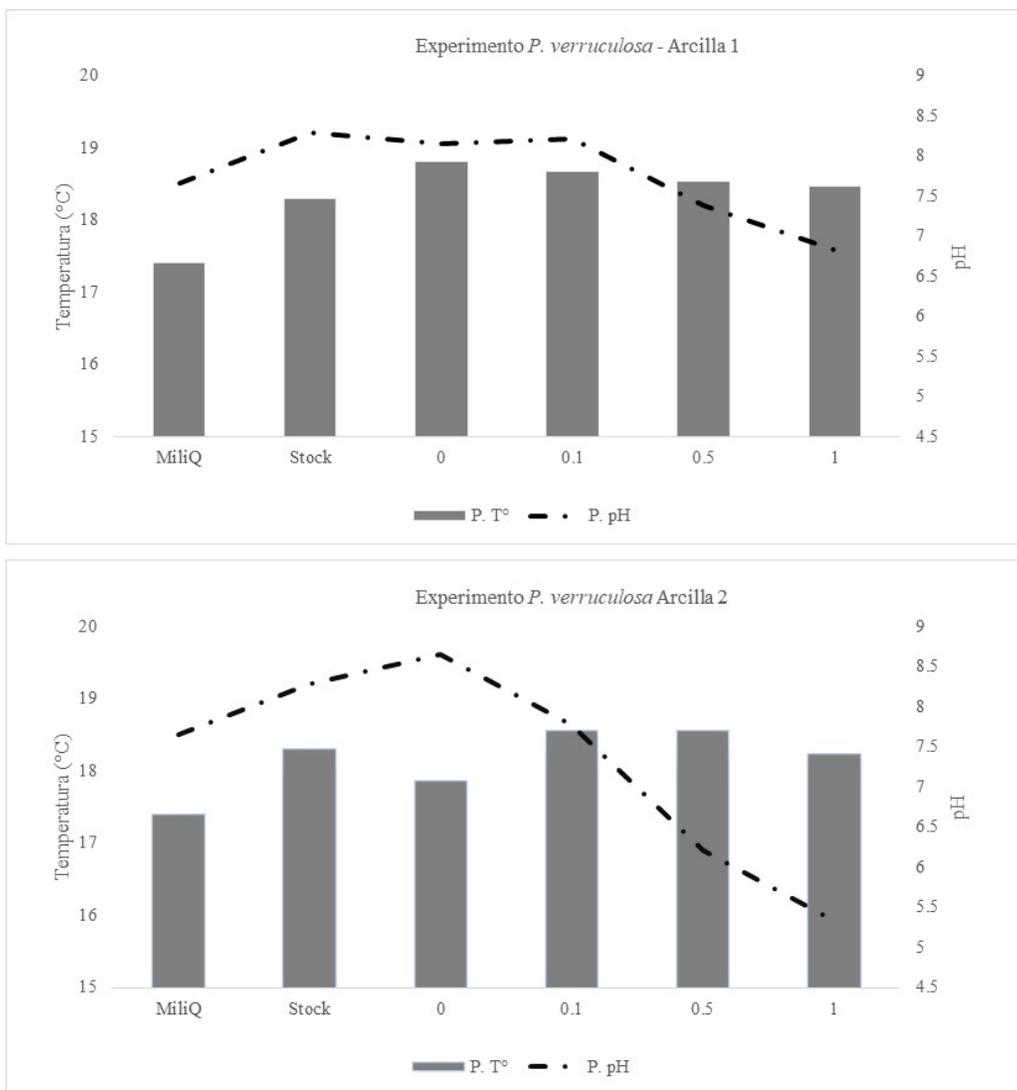
**Figura 74:** Medición de temperatura y pH post-experimentos de *P. verruculosa* (1000 céls/mL) expuesta dos tipos de arcillas modificadas a 25 de salinidad y 18 °C.

Al finalizar el periodo experimental de *P. verruculosa* (1000 céls/mL) expuesta a dos tipos de arcillas modificadas a 33 de salinidad y 12 °C. Se midió pH y temperatura en cada tratamiento. Los valores de muestran que, al incrementar las concentraciones de ambas arcilla disminuye el pH. La arcilla tipo 2, presenta un pH más bajo ( $\geq 5.2$ ). Lo cual influye directamente en la EF de la microalga. Lo que presenta una estrecha relación con la disminución de la EF de *K. selliformis* al ser estimada con el FRRf (**Figura 75**).



**Figura 75.** Medición de temperatura y pH post-experimentos de *P. verruculosa* (1.000 céls/mL) expuesta dos tipos de arcillas modificadas a 33 de salinidad y 12° C.

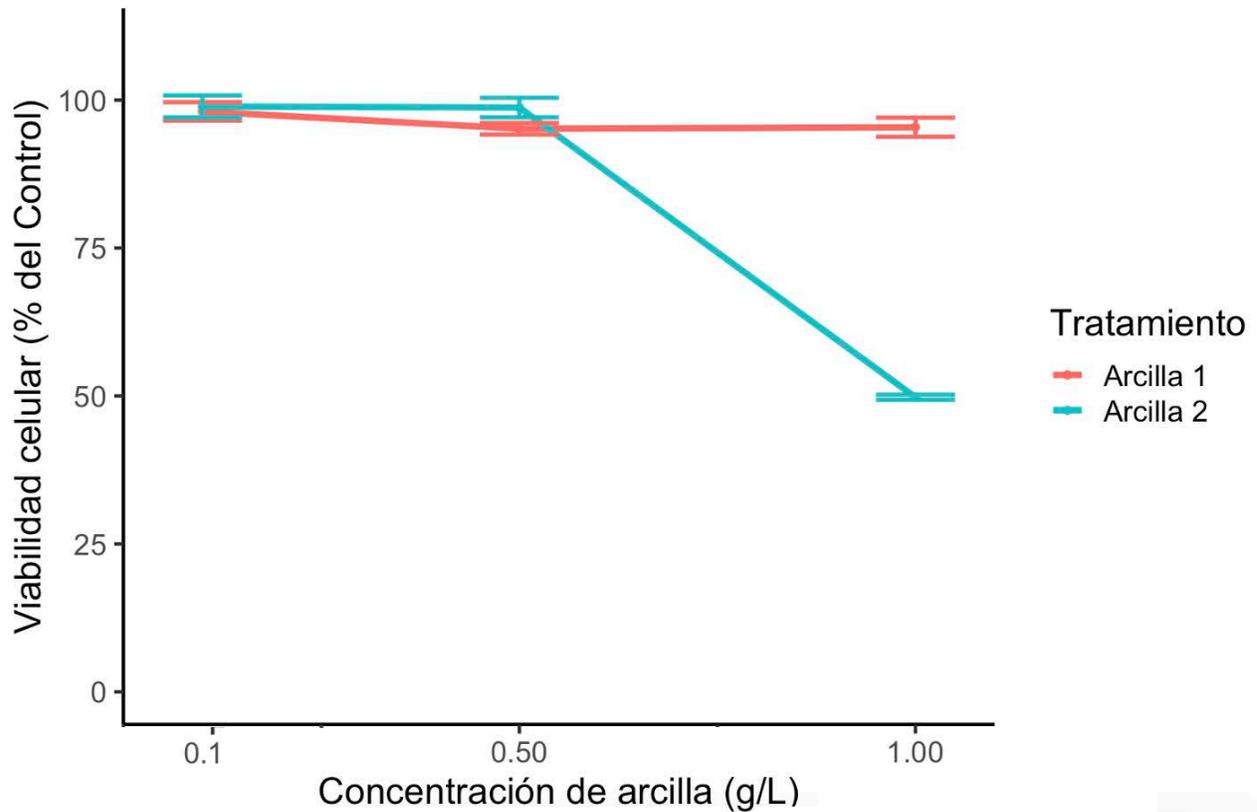
Al finalizar el periodo experimental de *P. verruculosa* (1000 céls/mL) expuesta a dos tipos de arcillas modificadas a 33 de salinidad y 18 °C. Se midió pH y temperatura en cada tratamiento. Los valores de muestran que, al incrementar las concentraciones de ambas arcilla disminuye el pH. La arcilla tipo 2, presenta un pH más bajo ( $\geq 5.2$ ). Lo cual influye directamente en la EF de la microalga. Lo que presenta una estrecha relación con la disminución de la EF de *K. selliformis* al ser estimada con el FRRf (**Figura 76**).



**Figura 76.** Medición de temperatura y pH post-experimentos de *P. verruculosa* (1.000 céls/mL) expuesta dos tipos de arcillas modificadas a 33 de salinidad y 18° C.

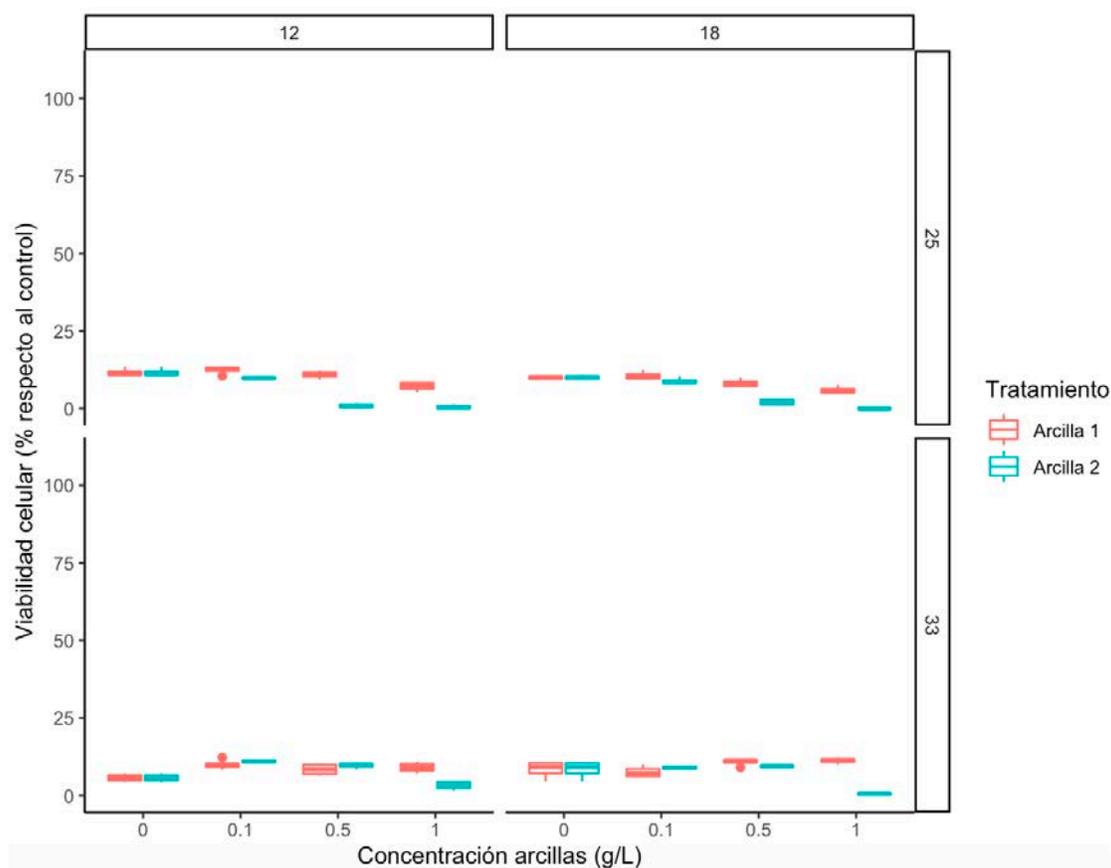
Líneas celulares monocultivo

Se expuso tres concentraciones de las dos arcillas modificadas utilizadas a las líneas celulares branquiales. Los resultados observados en la **figura 77** muestran que solo a altas concentraciones de arcilla (1 g/L) en la arcilla 2 disminuyen la viabilidad celular de las líneas celulares a menos de un 50%. Sin embargo, no se observa alguna disminución en la viabilidad celular en otra concentración o en la arcilla 1.



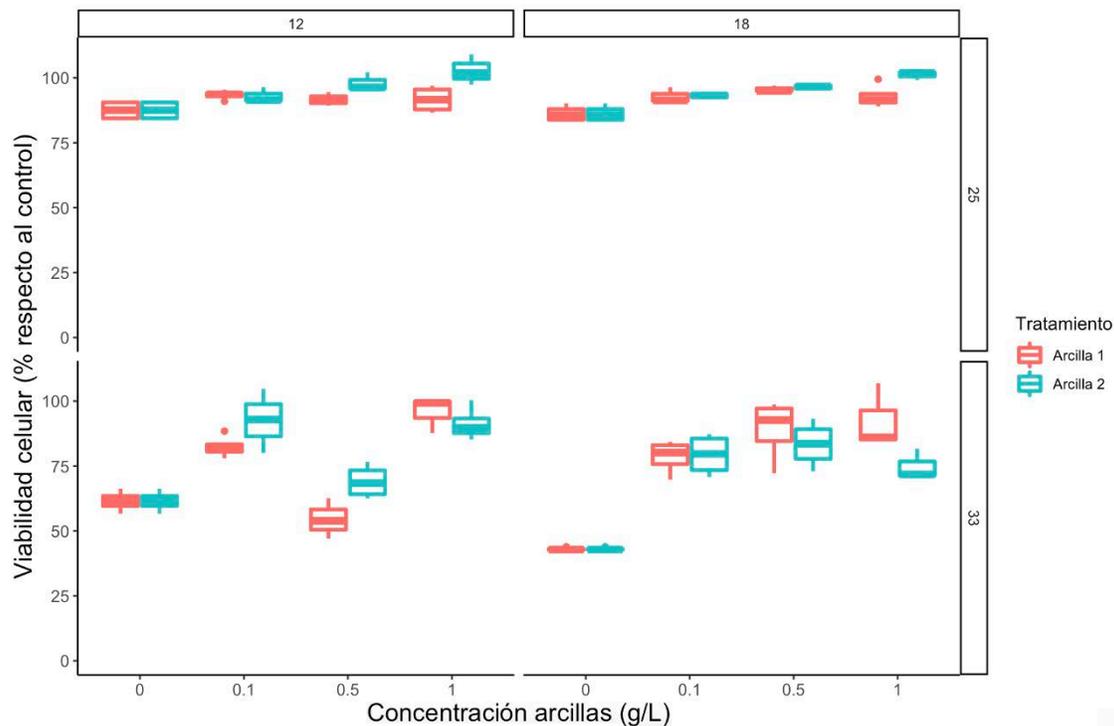
**Figura 77:** Efecto de la arcilla modificada sobre la viabilidad celular de líneas branquiales (RTgill-W1) luego de ser expuestas por dos horas a 3 tratamientos de arcilla (0,1 , 0,5 y 1 g/L) y a dos tipos de arcilla.

Se expuso el cultivo de *K. selliformis* posterior al tratamiento con las arcillas modificadas a las líneas celulares. Los resultados observados en la **figura 78** muestran que una severa disminución de la viabilidad celular en todos los tratamientos de arcillas, en el tratamiento control (0 g/L) y en todas las salinidades y temperaturas.



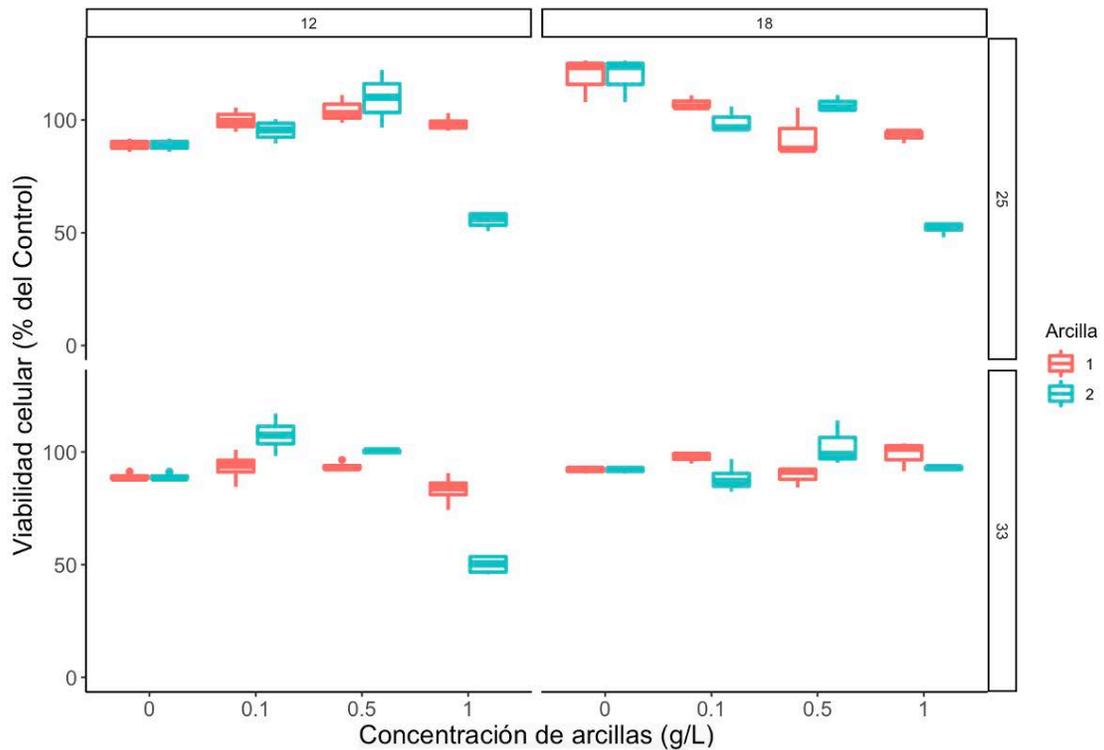
**Figura 78:** Efecto de diferentes concentraciones de dos arcillas modificadas (0, 0,1 , 0,5 , 1 g/L) sobre cultivos de 1000 céls/mL de *K. selliformis* en la viabilidad de células branquiales (RTgill-W1) durante 120 min a 12 y 18 °C de temperatura y a 25 y 33 de salinidad.

Se expuso el cultivo de *A. catenella* posterior al tratamiento con las arcillas modificadas a las líneas celulares. Se observó una tendencia al aumento de la viabilidad de las líneas celulares en a mayores concentraciones de arcillas modificadas en todas las temperaturas y salinidades (**Figura 79**)



**Figura 79:** Efecto de diferentes concentraciones de dos arcillas modificadas (0, 0,1 , 0,5 , 1 g/L) en cultivos 1000 céls/mL de *A. catenella* en la viabilidad de células branquiales (RTgill-W1) durante 120 min a 12 y 18 °C de temperatura y a 25 y 33 de salinidad.

Se expuso el cultivo de *P. verruculosa* posterior al tratamiento con las arcillas modificadas a las líneas celulares. Se observó una tendencia a la disminución de la viabilidad de las líneas celulares en altas concentraciones de arcillas modificadas en la salinidad 25 en ambas temperaturas y en la salinidad 33 a 12 °C. En específico, el tratamiento de la arcilla 2 presentó una mejor disminución en la viabilidad celular, en todas las condiciones exceptuando el experimento de 33 de salinidad y 18 °C (**Figura 80**).

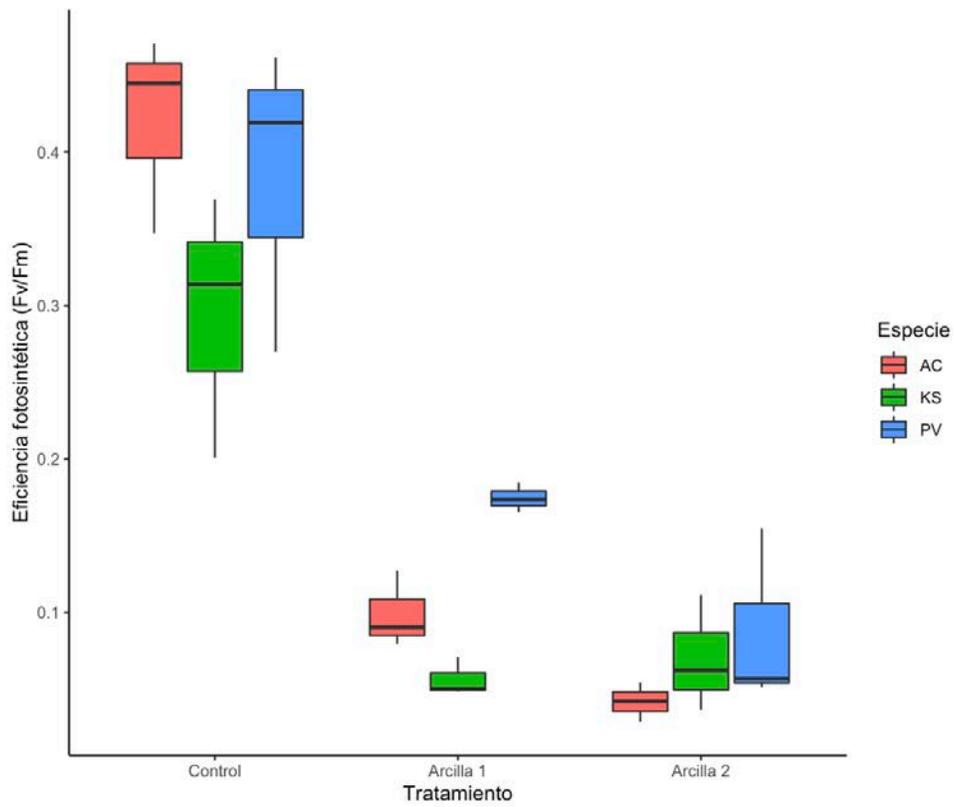


**Figura 80:** Efecto de diferentes concentraciones de dos arcillas modificadas (0, 0,1 , 0,5 , 1 g/L) en agua de mar filtrada (0.45 µm) 1000 céls/mL de *P. verruculosa* en la viabilidad de células branquiales (RTgill-W1) durante 120 min a 12 y 18 °C de temperatura y a 25 y 33 de salinidad.

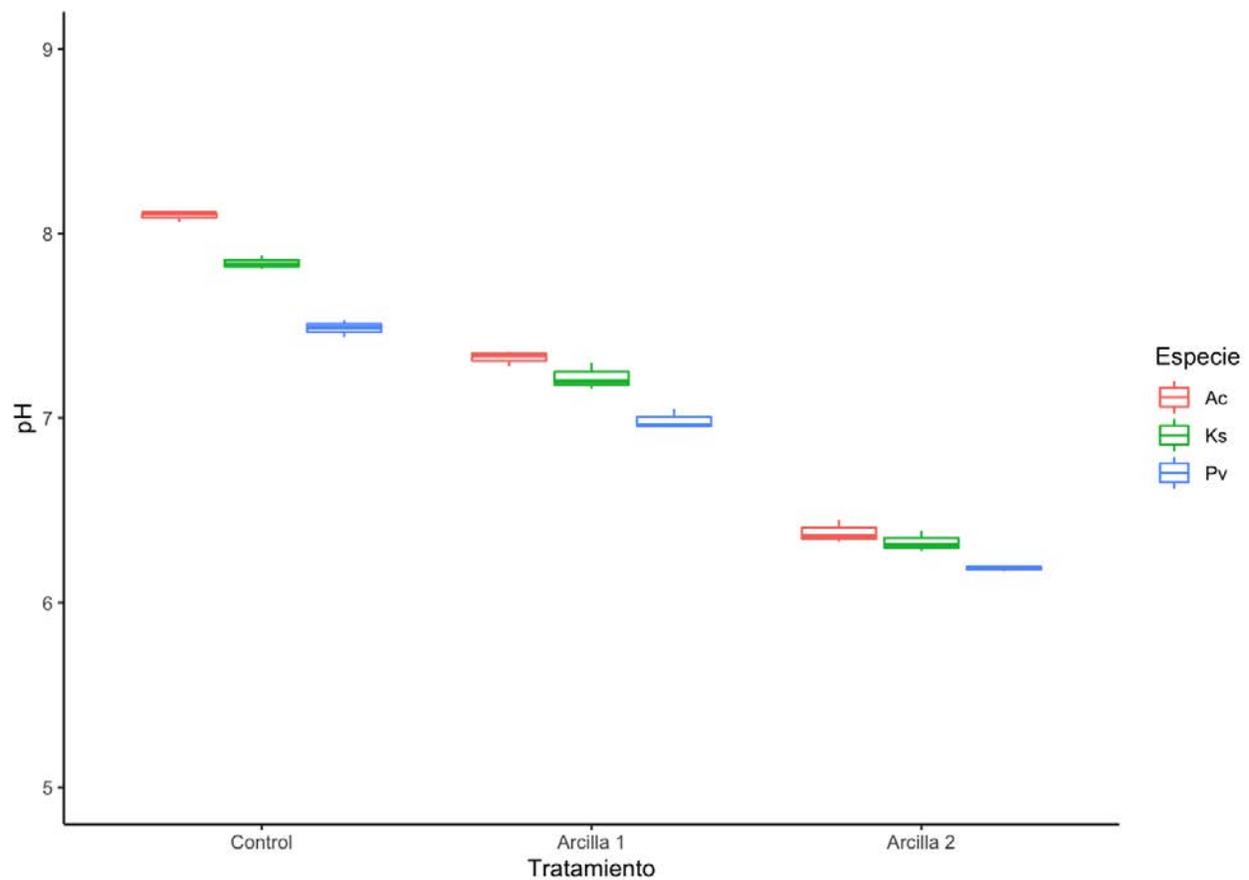
## 2) Experimentos con monocultivos con fitoplancton

### Efecto de las arcillas modificadas en la respuesta fotosintética y pH:

La condición experimental consideró abundancia celular de 1000 céls/mL de la especie objetivo y 1000 céls/mL de fitoplancton, a una salinidad de 33 y temperatura de 18 °C. Se evidenció una disminución de la actividad fotosintética en las 3 especies objetivo en ambas arcillas en comparación con su control (**Figura 81**). Se observa en la figura 82 que el pH disminuye en ambas arcillas, siendo mayor la baja en la arcilla 2.



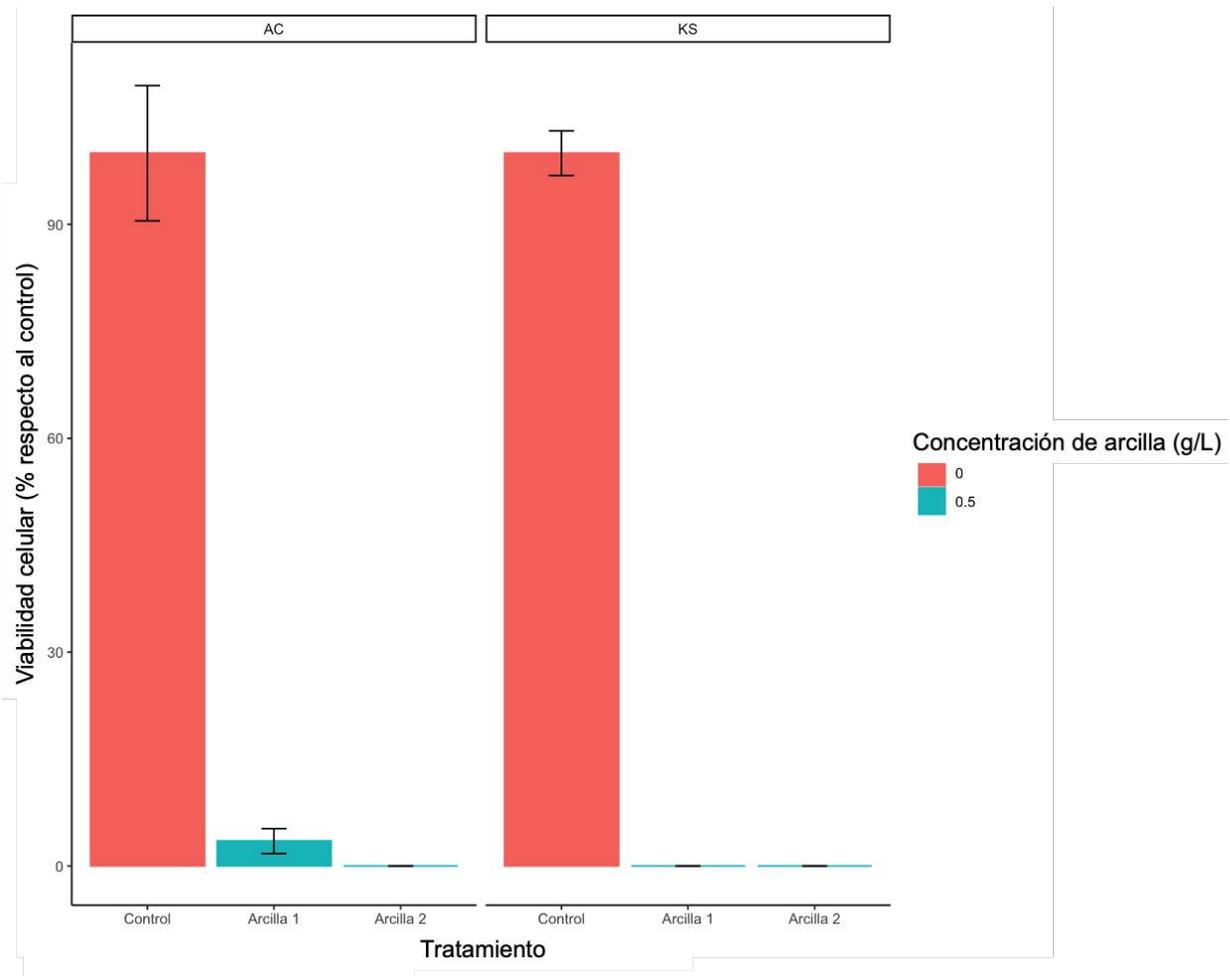
**Figura 81:** experimento para cuantificar el efecto de las arcillas sobre una comunidad de fitoplancton que contenía la mitad de las especies tóxicas. Se evidenció el efecto letal sobre la comunidad para ambas arcillas



**Figura 82:** Alteración del pH por acción de arcilla modificadas sobre la especies en estudio. Se observa como todas las especies se ven afectadas de la mis forma durante el tiempo de exposición.

### Viabilidad celular de las microalgas

Para ambas especies se observó que en ambos tipos de arcillas modificadas disminuye la viabilidad cerca de 0%. Lo que indica que la viabilidad de las especies objetivo cuando están con fitoplancton es similar a la viabilidad del monocultivo a esas concentraciones de arcilla (**Figura 83**).

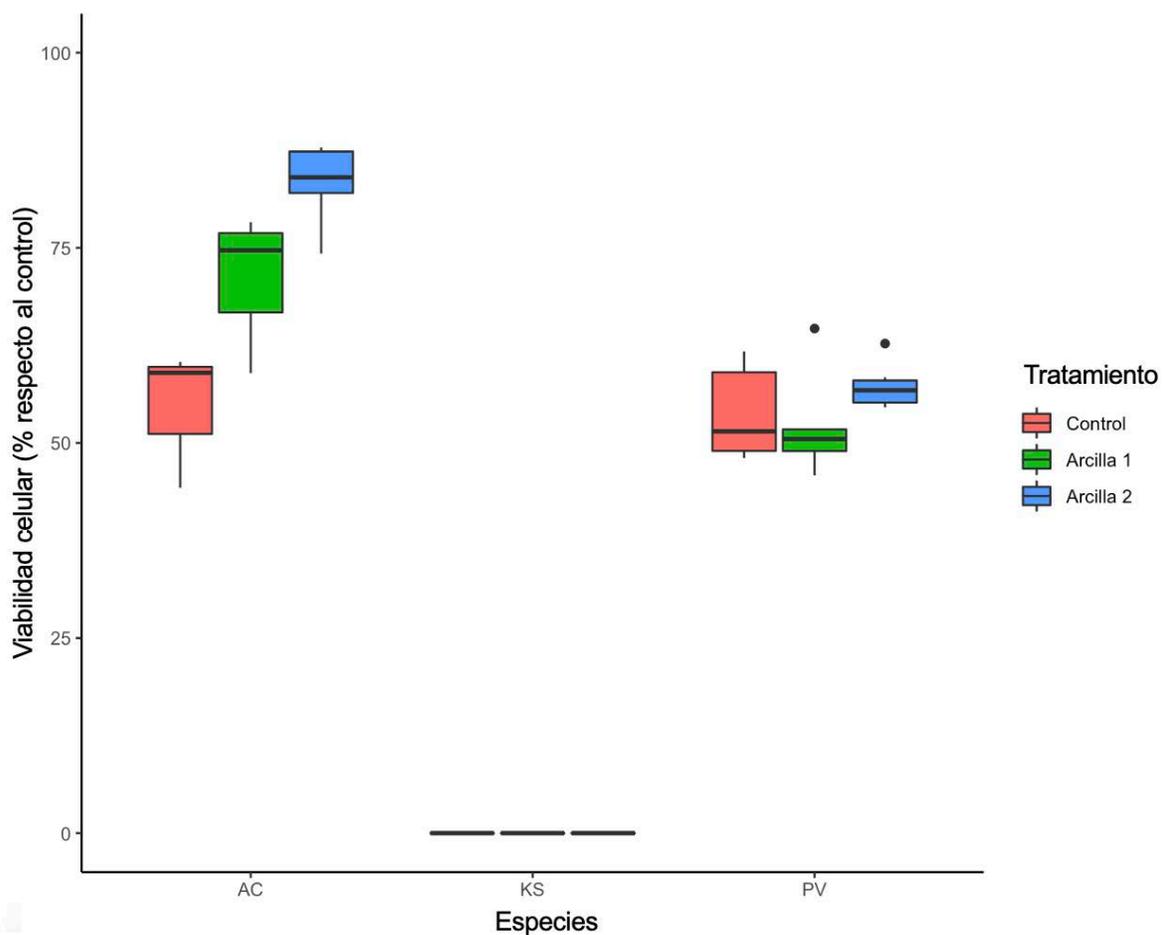


**Figura 83:** Efecto de dos arcillas modificadas en la viabilidad celular de *A. catenella* (AC) y *K. selliformis* (KS) con fitoplancton a una concentración de 0,5 g/L .

### Viabilidad en líneas celulares

La evaluación de la viabilidad celular de la especie *P. verruculosa* con fitoplancton expuesto a las dos arcillas presentó valores mayores al 50% de viabilidad y su viabilidad fue igual al control. Mientras tanto la especie *A. catenella* con fitoplancton presentó un aumento en su viabilidad celular al utilizar las arcillas, donde la arcilla 2 se observó con una viabilidad cercana al 90%, la arcilla 1 con una viabilidad del 75% aproximadamente y el control sin arcillas presento una viabilidad cercana al 60%. En la especie *K. selliformis* se observó una viabilidad del 0% en todos los tratamientos (control y con arcilla) (**Figura**

84).

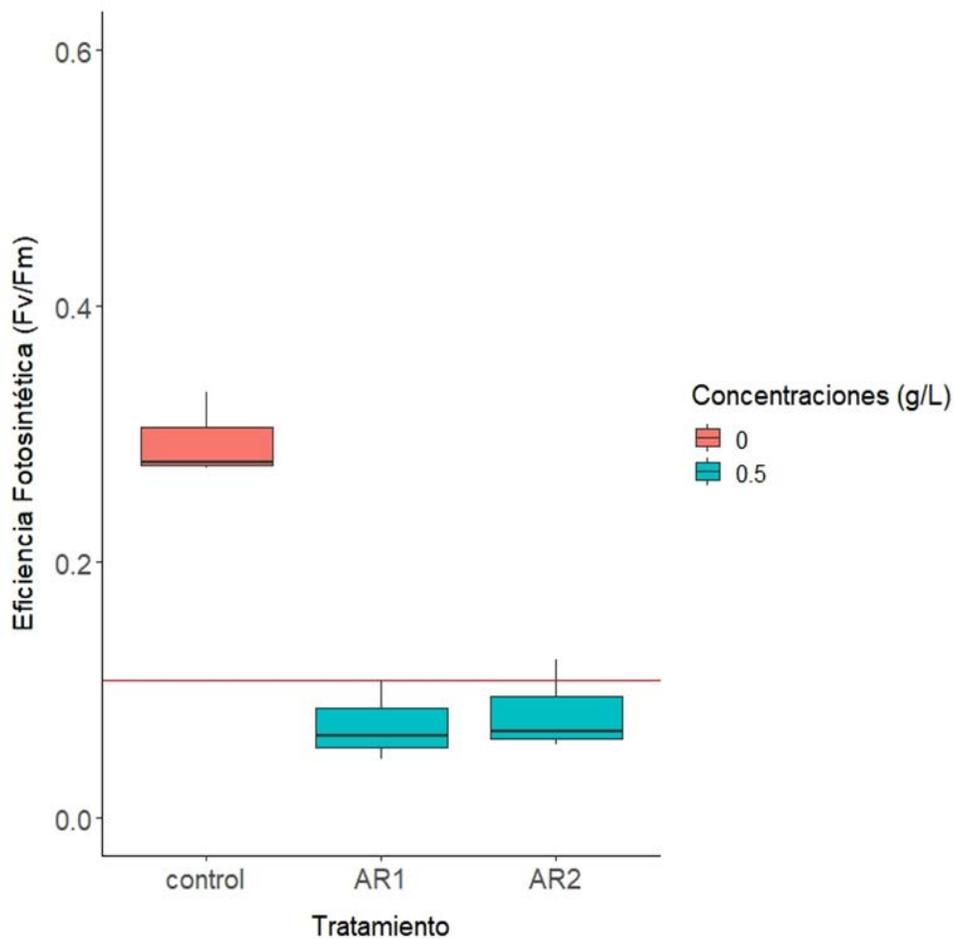


**Figura 84:** Efecto de las arcillas modificadas sobre microalgas objetivos con fitoplancton en la viabilidad de células branquiales. (RTgill-W1). Expuestas a dos tipos de arcilla a una concentración de 0,5 g/L. A una densidad celular de 1000 céls/mL de *A. catenella* (AC), *K. selliformis* (KS) y *P. verruculosa* (PV) y 1000 céls/mL de fitoplancton. Las mediciones se hicieron por cuadruplicado.

### 3) Experimentos en terreno con mesocosmos

#### Efecto de la arcilla modificada en la respuesta fotosintética del mesocosmos del fiordo Comau

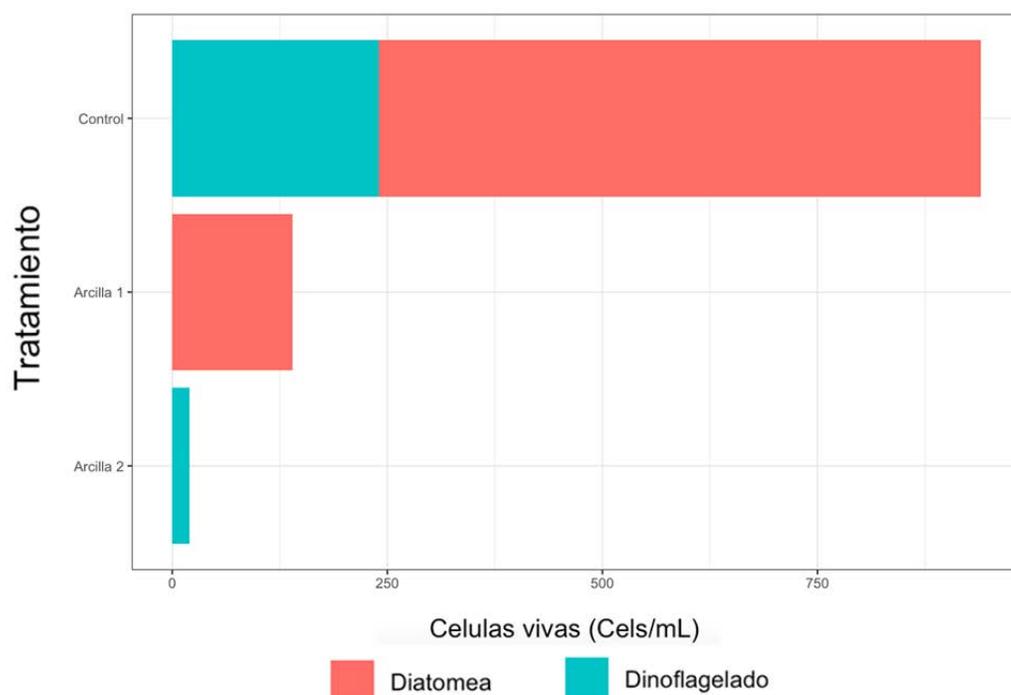
En la evaluación del estado fisiológico del fitoplancton presente en el mesocosmos del fiordo Comau expuesto a una concentración de 0,5 g/L de dos arcillas modificadas, este presentó una disminución de la eficiencia fotosintética (EF) posterior a las 2 hora de exposición, en contraste con el control (**Figura 85**).



**Figura 85:** Efecto en la eficiencia fotosintética (Fv/Fm) del fitoplancton presente en el mesocosmos del fiordo Comau expuesto a dos tratamientos con distintas arcillas modificadas (AR1 y AR2). La concentración final de las arcillas fue de 0.5 g/L. Se midió a las 2 horas posterior de añadido las arcillas. Se realizó el experimento en triplicado.

### Efecto de la arcilla modificada en la viabilidad celular del mesocosmos del fiordo Comau

Se observó que en ambas arcillas la viabilidad celular de las microalgas del mesocosmos disminuyó, en comparación al control sin arcilla. En la arcilla 1 se observó que las células que sobrevivieron a este tratamiento fueron del grupo diatomeas, mientras que la arcilla 2 fueron dinoflagelados (**Figura 86**)



**Figura 86:** Efecto en la viabilidad celular del fitoplancton presente en el mesocosmos del fiordo Comau expuesto a dos tratamientos con distintas arcillas modificadas (Arcilla 1 y Arcilla 2). La concentración final de las arcillas fue de 0,5 g/L. Se midió a las 2 horas posterior de añadido las arcillas. Se realizó el experimento en triplicado.

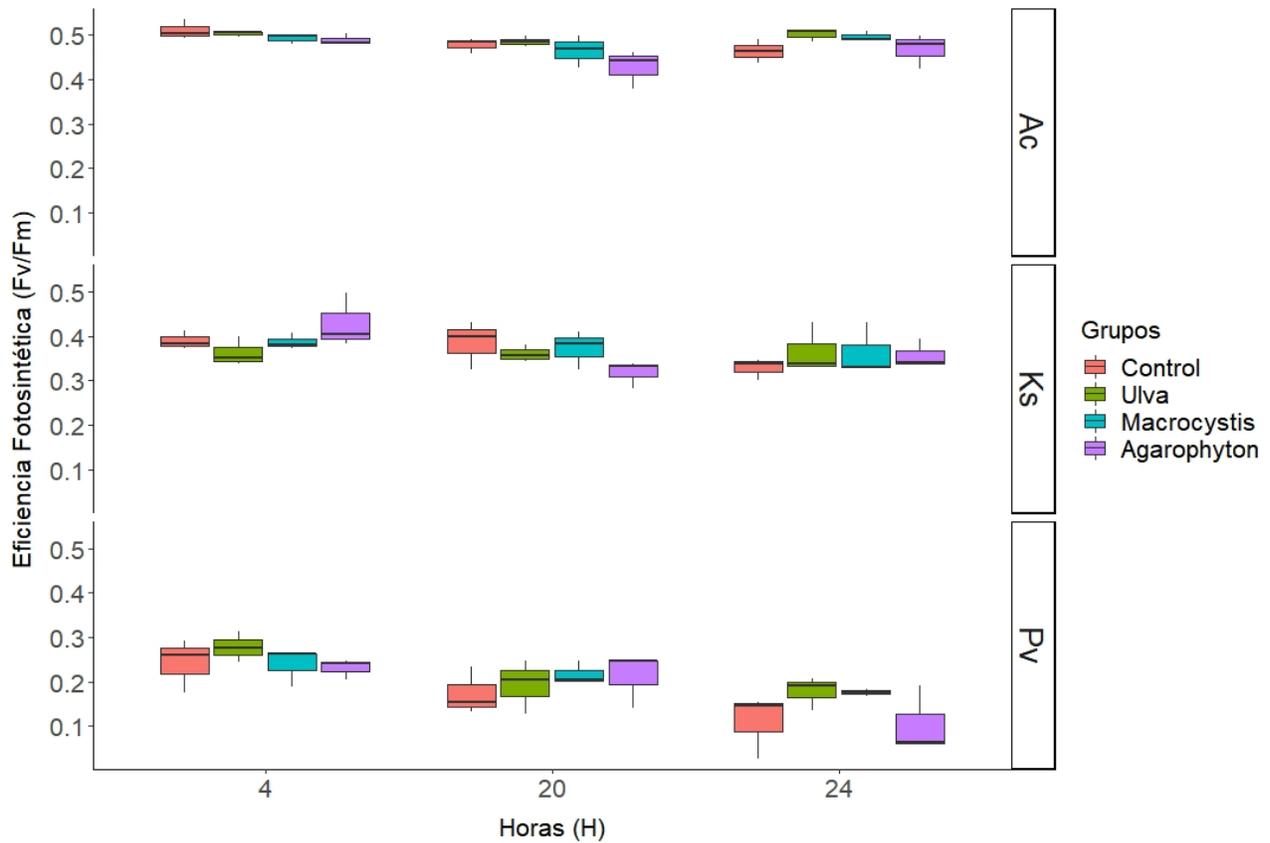
### 9.2.3.2 Macroalgas

#### 1) Experimentos con monocultivos

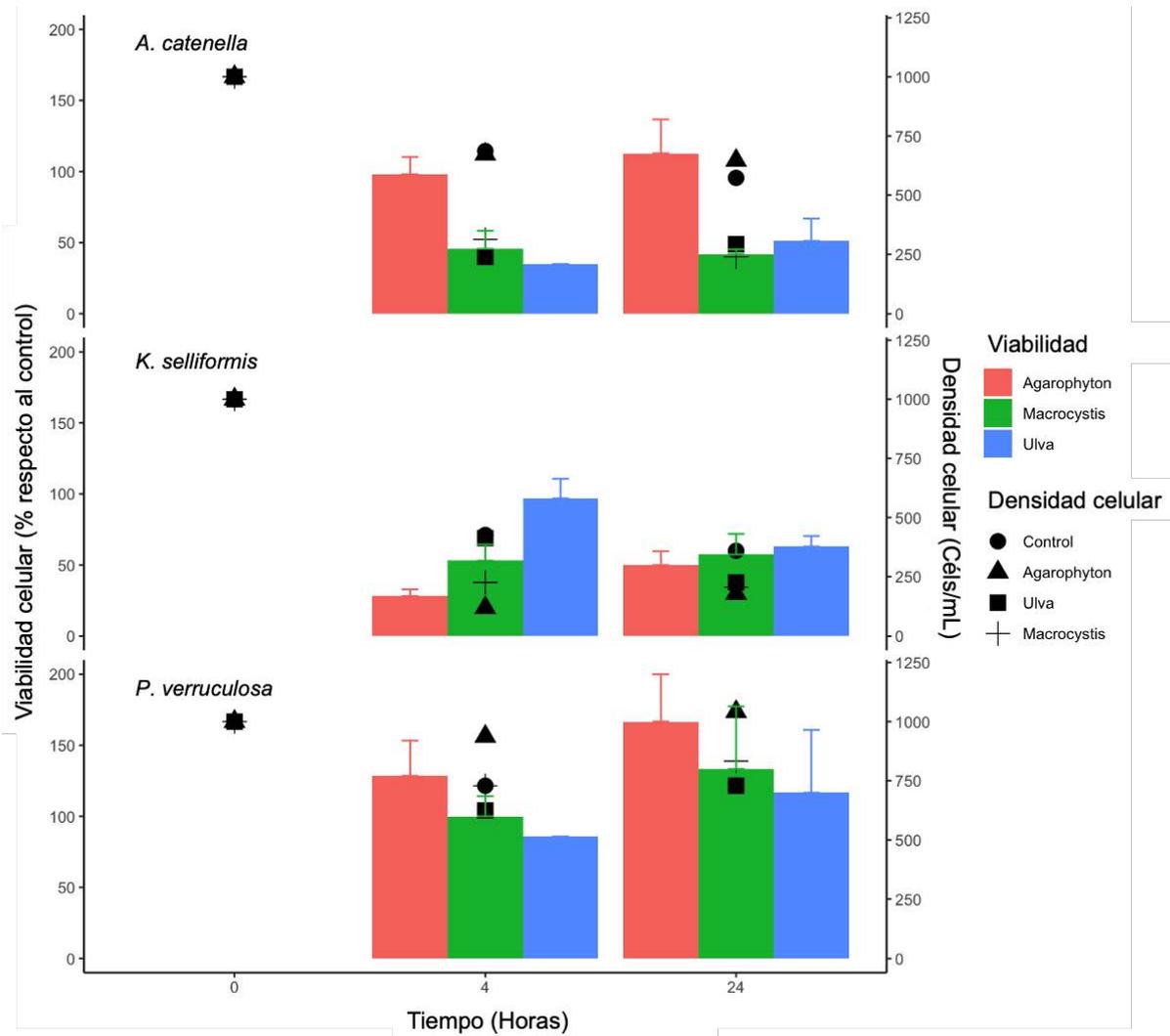
La eficiencia fotosintética de las especies FANs no fue significativamente afectada luego de ser mantenidas en co-cultivo con macroalgas (**Figura 87**). No obstante, se registró una disminución de la densidad y viabilidad celular para ciertas especies FANs en comparación con el control (**Figura 88**). Así, la viabilidad y densidad celular de *A. catenella* disminuyó cuando se mantuvo en cultivo con *Macrocystis* y *Ulva.*, aunque, al ser mantenida junto a *Agarophyton* no se observaron cambios. Por el contrario, la viabilidad y densidad de *K. selliformis* disminuyó al ser cultivada con *Agarophyton*. No obstante, luego de 24 horas de cultivo con las macroalgas la viabilidad y densidad celular de *K. selliformis* disminuyó. Para el caso de *P. verruculosa* no se observó una disminución significativa de la viabilidad y densidad celular luego de mantenerla en cultivo con las distintas especies de macroalga y por distintos tiempos de exposición (**Figura 88**).

Respecto a los efectos citotóxicos, se observaron respuestas especie-específicas. En el control de *A. catenella* se observaron efectos citotóxicos al coleccionar muestras tanto dentro del frasco de cultivo como desde el estanque de cultivo, indicando que las ictiotoxinas pueden difundir a través del frasco hacia el estanque. Al mantener a *A. catenella* en cultivo con macroalgas no se observaron diferencias en los efectos citotóxicos respecto al control. Por el contrario, el control de *K. selliformis* mostró que las muestras tomadas desde el frasco de cultivo generaron severos efectos citotóxicos. Posiblemente estas toxinas no fueron capaces de difundir hacia el estanque debido a que la muestra tomada en este no generó una disminución de la viabilidad de las células branquiales. Interesantemente, al mantener en cultivo a *K. selliformis* con todas las macroalgas se observa un aumento de la viabilidad de células branquiales lo que indicaría que el co-cultivo es eficaz para disminuir la citotoxicidad de *K. selliformis*. Para el caso de *P. verruculosa* no se observaron efectos citotóxicos. Este es un resultado que ya ha sido reportado por otros trabajos que indica que *P. verruculosa* no es citotóxica a bajas densidades (**Figura 89**).

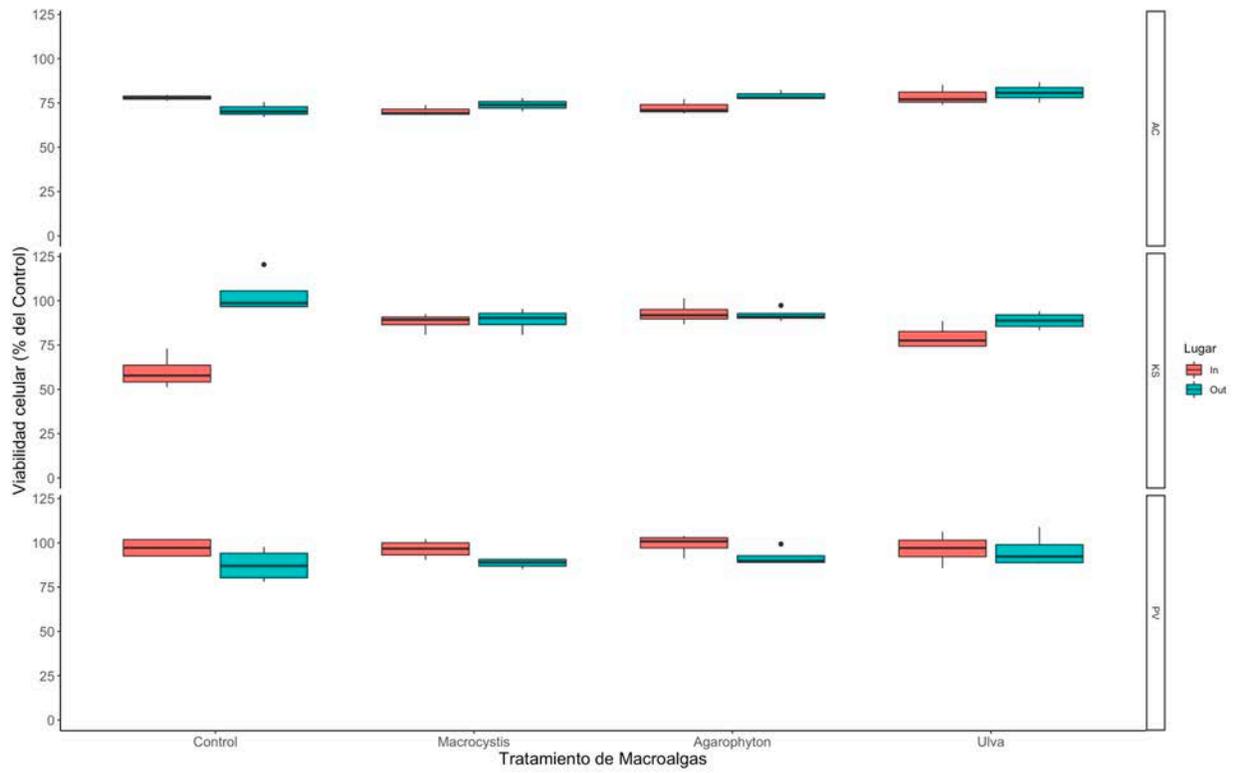
Finalmente, se observó un incremento del pH en el estanque al mantener las macroalgas en cultivo con las especies FANs. El aumento de pH es un fenómeno que se produce por la actividad fotosintéticas de las macroalgas que incluyen la fijación de CO<sub>2</sub> (**Figura 90**).



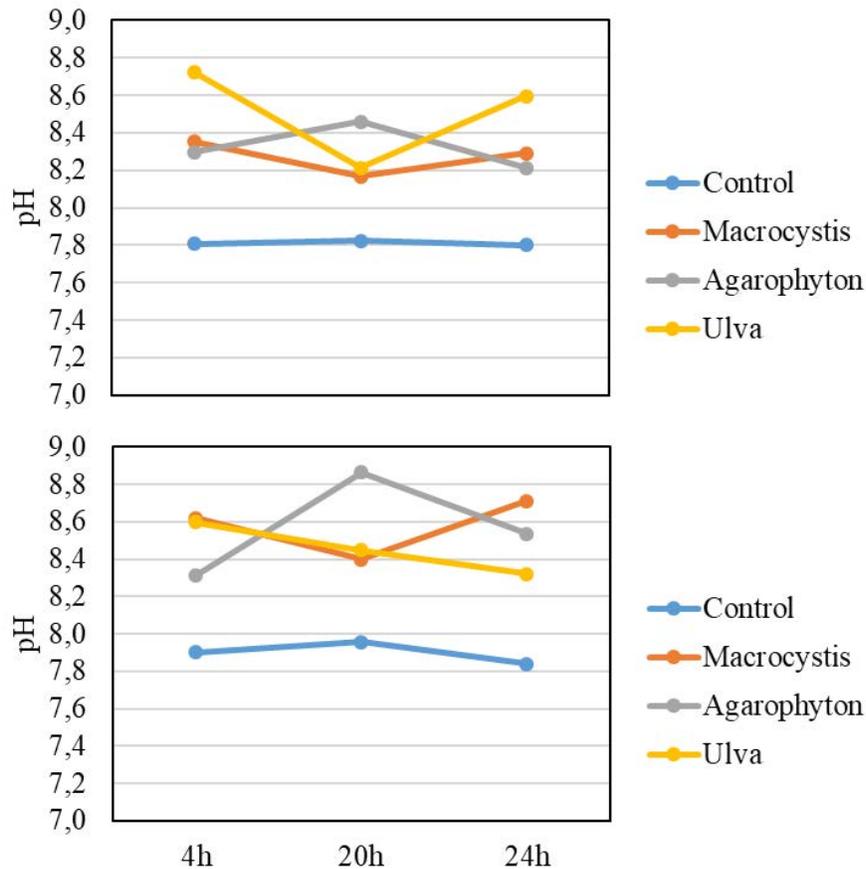
**Figura 87:** Eficiencia fotosintética de *A. catenella* (Ac), *K. selliformis* (Ks) y *P. verruculosa* (Pv), (1000 céls/mL), expuestas a diferentes macroalgas, a 33 psu, a 12°C y un período de 24h.



**Figura 88:** Viabilidad celular de especies FANs (barras) luego de mantenerlas en cultivo con macroalgas. Símbolos negros muestran la densidad celular de las especies FANs luego de mantenerlas en cultivo con distintas macroalgas.



**Figura 89:** Viabilidad de células branquiales expuestas a muestras de agua tomadas desde los frascos de cultivo de especies FANs (in) y muestras de agua tomadas desde los estanques (out).

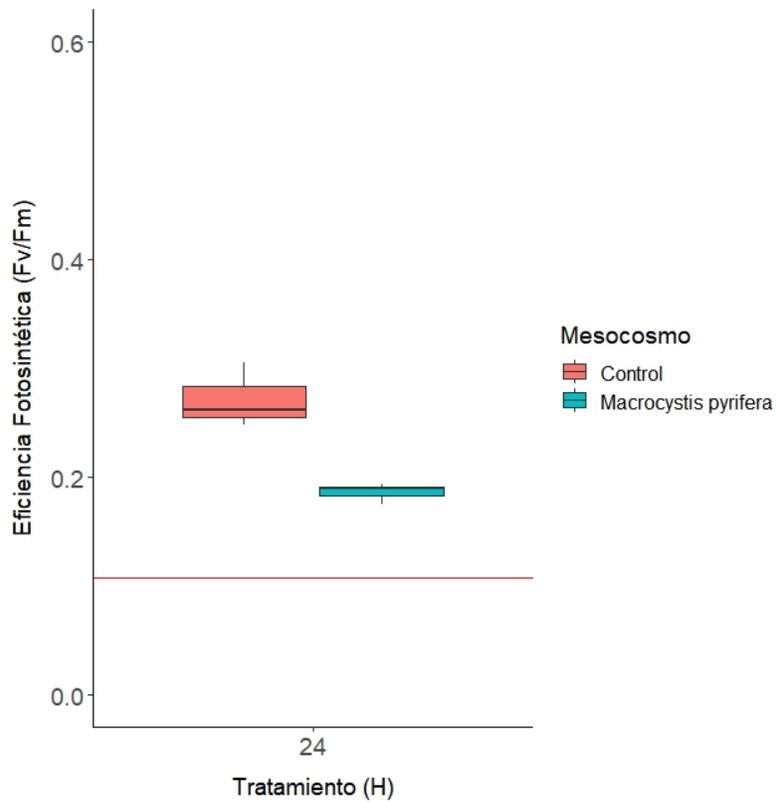


**Figura 90:** Variación de pH dentro de los estanques de co-cultivo de macroalgas y *K. selliformis* (superior) y *A. catenella* (inferior).

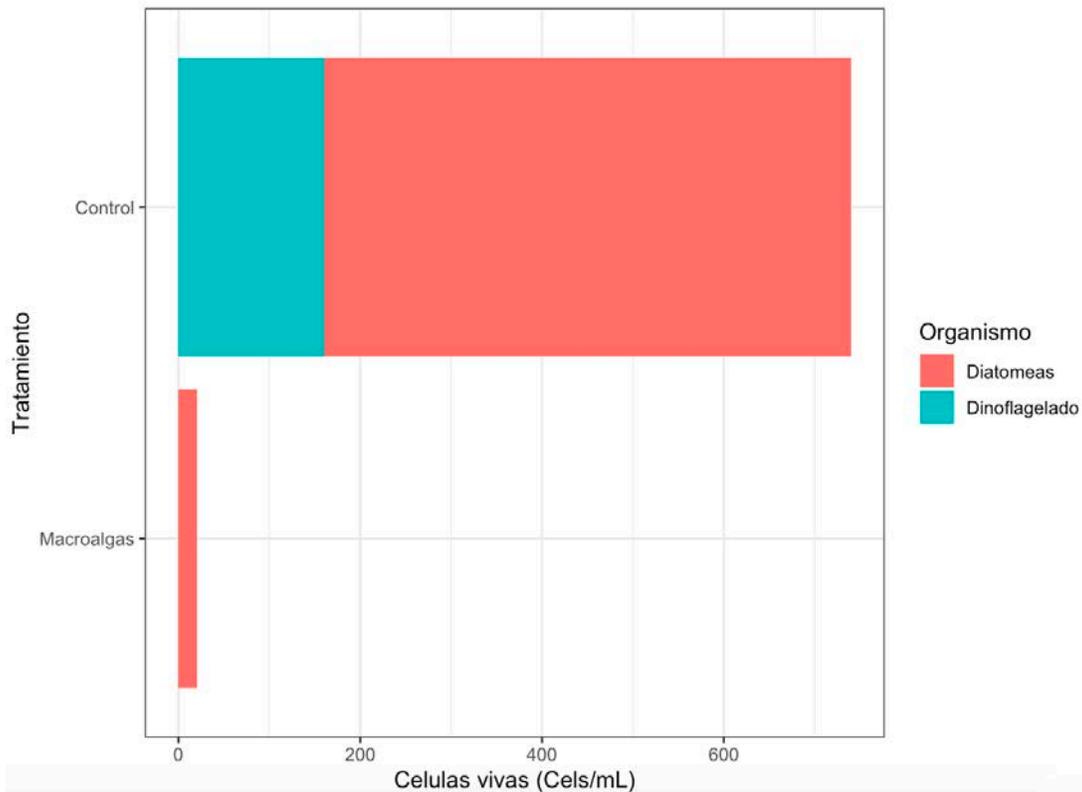
## 2) Experimentos con mesocosmos

Luego de mantener en co-cultivo a la comunidad fitoplancton con *M. pyrifera* por 24 horas se midió la eficiencia fotosintética. Así, se observó una significativa disminución de la eficiencia fotosintética de la comunidad en comparación con el control (**Figura 91**). Además, la evaluación de la viabilidad celular evidenció que los dinoflagelados sufrieron una severa mortalidad, en tanto que algunas diatomeas pudieron sobrevivir (**Figura 92**). Tanto los dinoflagelados como las diatomeas fueron severamente afectados por el co-cultivo sugiriendo efectos alelopáticos de *M. pyrifera* sobre la comunidad fitoplanctónica. Es importante destacar que, en este experimento, a diferencia del anterior, el alga fue

cortada e inmediatamente adicionada al estanque, en consecuencia, se puede haber generado una peroxidación lipídica junto con la presencia de polisacáridos, los cuales podrían haber generado efectos de mortalidad en la comunidad fitoplanctónica.



**Figura 91:** Eficiencia fotosintética de la comunidad fitoplanctónica luego de ser mantenida en co-cultivo con 25 gr. macroalga (*Macrocystis pyrifera*).



**Figura 92:** Viabilidad celular de la comunidad fitoplanctónica luego de ser mantenida en co-cultivo con 25 gr. macroalga (*Macrocystis pyrifera*). La comunidad se encuentra dominada por diatomeas (Rojo) y dinoflagelados (azul).

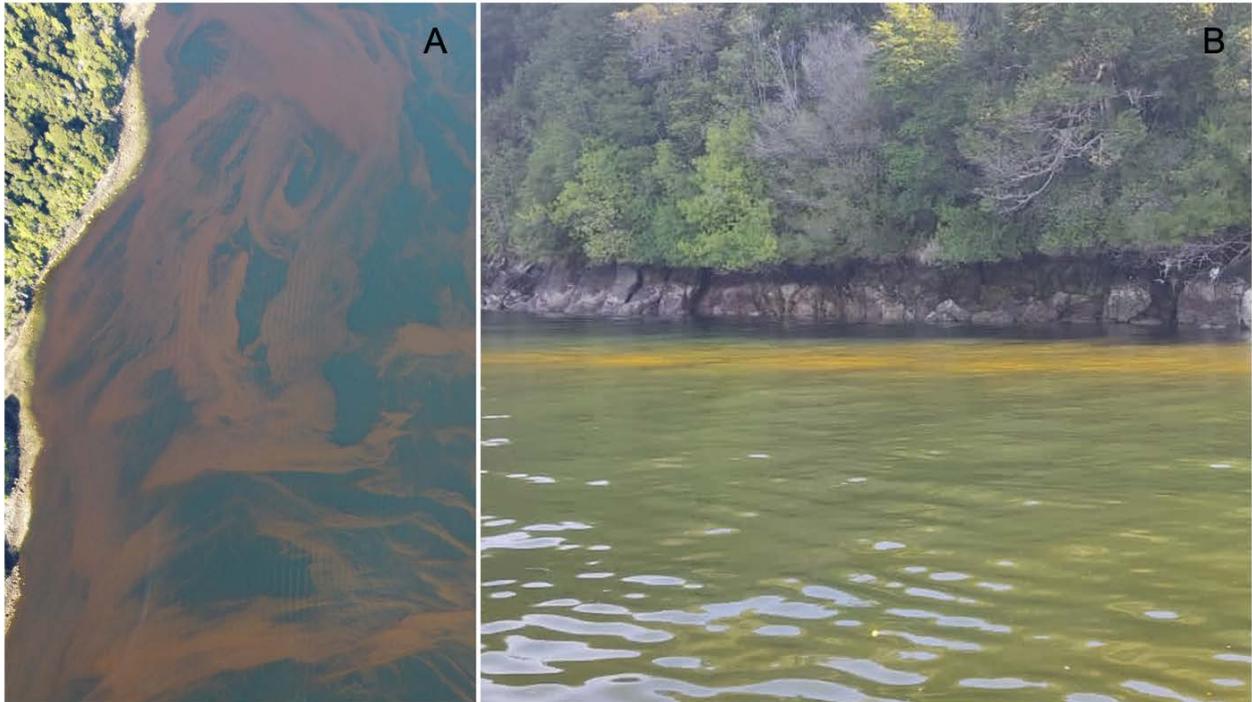
### 9.2.3.3. Cortinas de Burbujas

- 1) Evaluación del funcionamiento de las cortinas de burbujas en centro de cultivo fiordo Comau

#### Características de la floración de *H. akashiwo* en el fiordo Comau

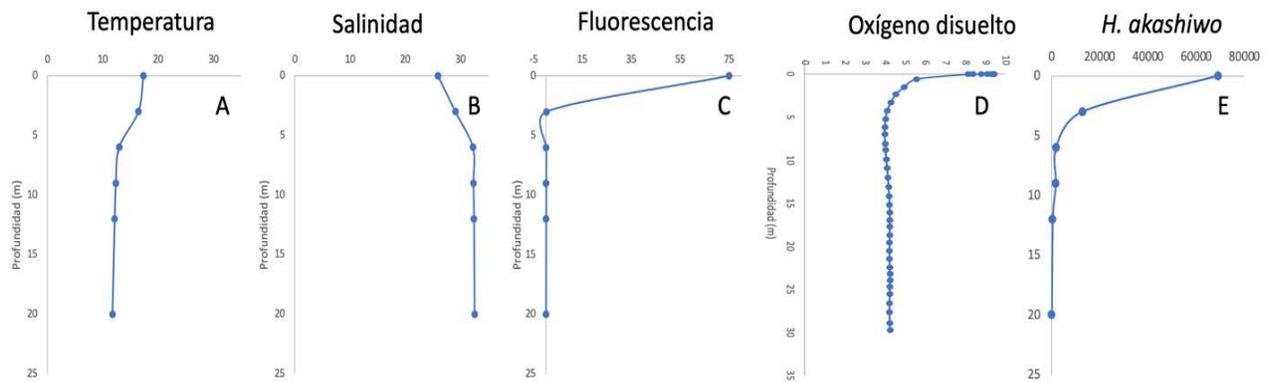
La inspección aérea del fiordo mostró una intensa discoloración de la columna de agua con una marcada intensificación en la zona Este del fiordo Comau (**Figura 93A**). La inspección *in situ* permitió determinar que esta discoloración no permitía el paso de luz con un disco Secchi inferior a 0.5 m en algunas zonas costeras (**Figura 93B**). Los perfiles de CTD mostraron una columna de agua fuertemente estratificada con una picnoclina

establecida a 5 m de profundidad. La temperatura en superficie fue de 17 °C y variando entre 12 °C a 10 °C entre los 5 m y 20 m, respectivamente (**Figura 94A**).



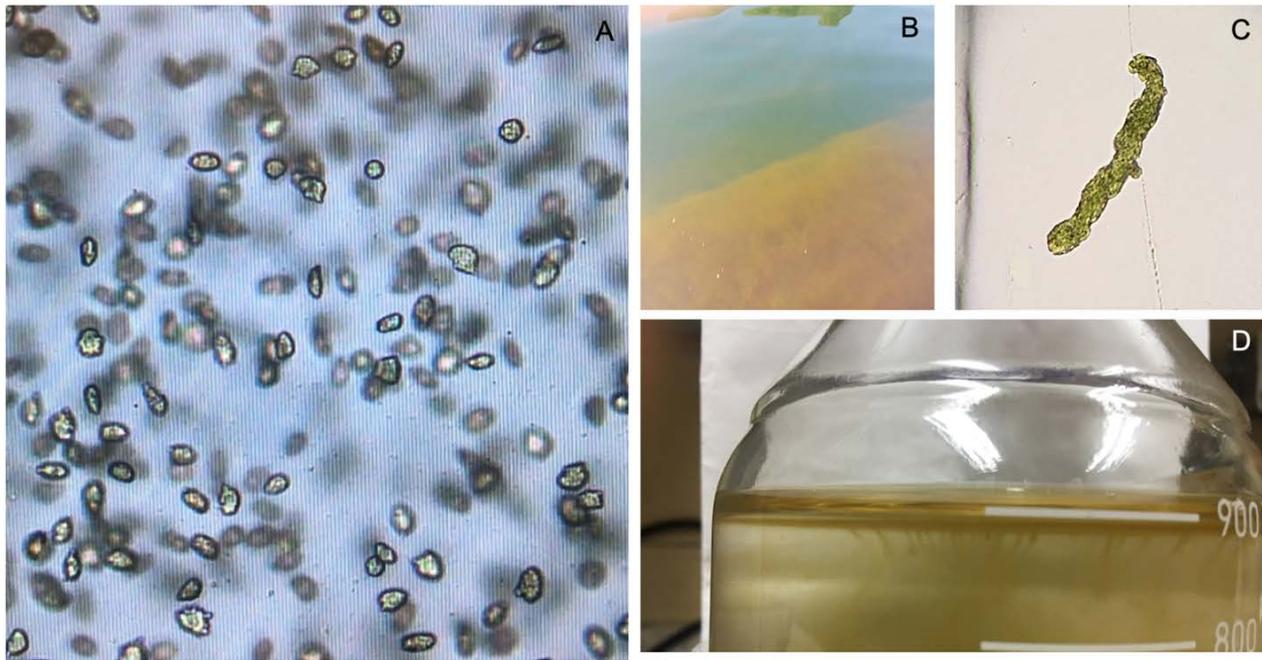
**Figura 93.** Discoloración superficial de la columna de agua en el fiordo Comau debido a la floración de *H. akashiwo* el 5 de abril de 2021. A) Vista aérea mediante dron y B) vista *in situ*.

La salinidad fluctuó entre 26 psu en superficie y 31.5 psu a los 5 m de profundidad, manteniendo esta salinidad hasta los 20 m (**Figura 94B**). La fluorescencia mostró un valor máximo en superficie de 75  $\mu\text{g/L}$  y disminuyendo marcadamente valores que fluctuaron entre 0.9 y 0  $\mu\text{g/L}$  entre los 3 y 20 m de profundidad (**Figura 94C**). El OD mostró valores máximos de 9.6 mg/L en superficie, disminuyendo gradualmente a 4 mg/L a los 5 m de profundidad, valor que se mantuvo constante hasta los 20 m de profundidad (**Figura 94D**).



**Figura 94:** Perfiles de CTD-O/F en área de mayor concentración celular de *H. akashiwo* en el fiordo Comau según inspección aérea. A) Temperatura (°C); B) salinidad (psu); C) Fluorescencia (µg/L); D) oxígeno disuelto (mg/L) y abundancia celular de *H. akashiwo* (células/ mL).

Las observaciones en microscopía de luz mostraron que la floración de *H. akashiwo* fue mono-específica (**Figura 95A**) con una abundancia celular que alcanzó las 70000 céls/mL en superficie, con valores que no superaron las 1500 céls/mL entre los 5 y 20 m de profundidad (**Figura 94E**). Otras observaciones *in situ* incluyen la detección de aglomeraciones celulares (**Figura 95B**) producto de la potencial excreción celular de un exo-polímero glutinoso. Estas aglutinaciones celulares se formaron en las muestras colectadas luego de un par de horas del muestreo (**Figura 95D**), lo que obligó a un conteo inmediato después de muestrear. Además, se observó la presencia de pellets fecales de copépodos, lo cual indicaría la presencia de depredación de *H. akashiwo* por parte del zooplancton (**Figura 95C**).

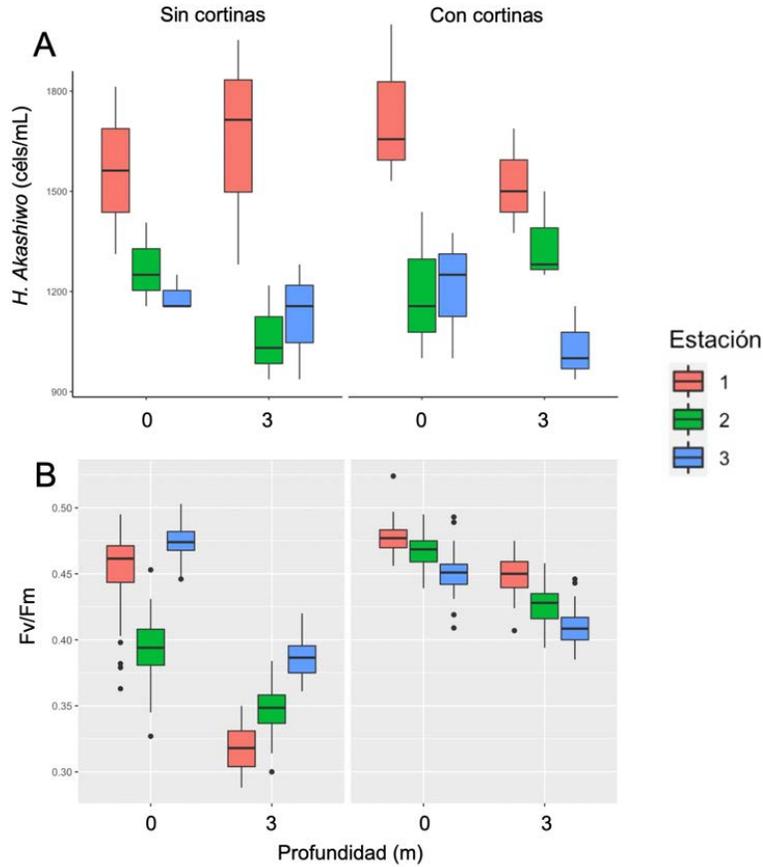


**Figura 95.** A) Floración mono-específica de *H. akashiwo* en otoño del 2021 en el fiordo Comau; B) formación in situ de agregaciones celulares de *H. akashiwo*; C) pellet fecal de copépodo formado con células de *H. akashiwo* y D) agregaciones celulares de *H. akashiwo* en frascos de muestreo luego de pocas horas de realizado el muestreo.

Como antecedente se constató mediante entrevista con los operarios del centro de cultivo que el sistema de cortina de burbujas no cuenta con un protocolo de activación que considere las características de la floración como tipo de microalga, densidad celular y/o daño ejercido en los peces (ej., mecánico o tóxico).

No se identificaron cambios en la cuantificación celular de *H. akashiwo* entre el periodo sin activación de cortinas y con cortinas activas. De esta manera no se observaron efectos de las cortinas tanto en superficie como en 3 metros de profundidad ni en las estaciones dentro del módulo de cultivo (estación 1), sobre las cortinas (estación 2) y fuera de las cortinas (estación 3) (Figura 96A). Al contrario, la eficiencia fotosintética de las microalgas si mostró cambios entre los periodos de cortinas apagadas y encendidas. Con las cortinas apagadas se observó una mayor eficiencia en superficie comparada con las muestras obtenidas a 3 m de profundidad. Con las cortinas encendidas, todos los valores de

eficiencia, tanto en las 3 estaciones de muestreo como en las dos profundidades, mostraron un incremento (Figura 96B).



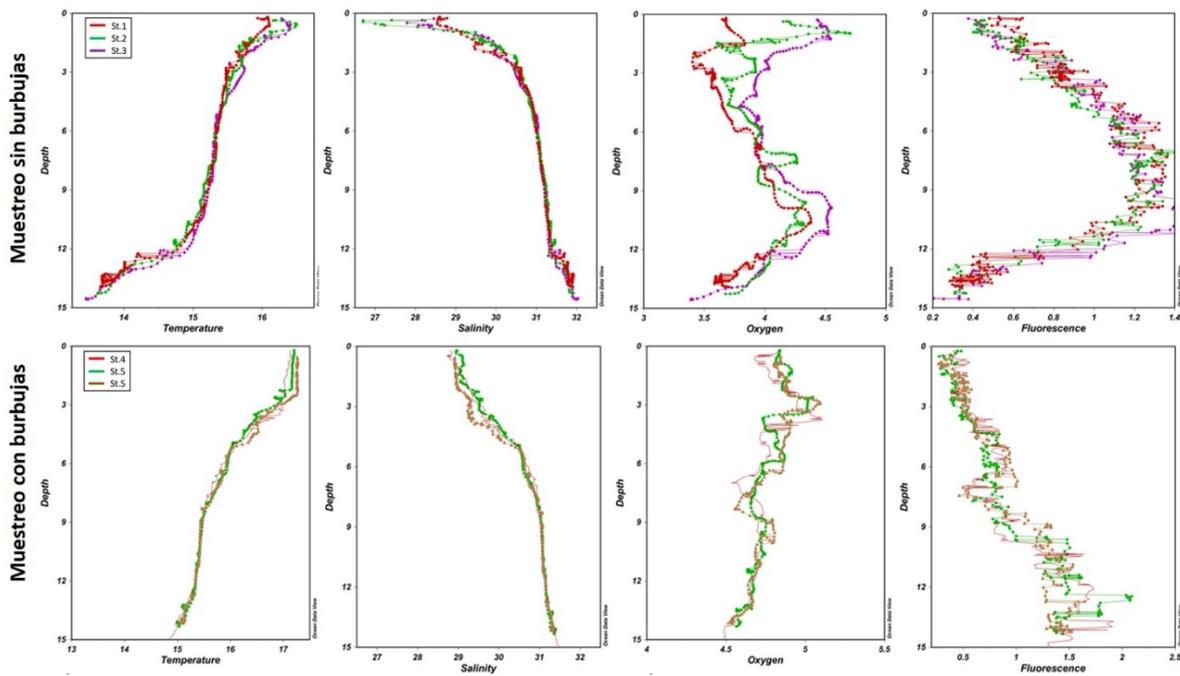
**Figura 96.** Box plot de los resultados experimentales de la A) abundancia celular de *H. akashiwo* y B) eficiencia fotosintética de microalgas en 3 estaciones de muestreo, a dos profundidades (0 y 3 m) y en tiempo 0 (sin cortina de burbujas) y tiempo 1 (con cortinas de burbujas).

2) Evaluación del funcionamiento de las cortinas de burbujas en centro de cultivo en Caleta el Manzano

Características oceanográficas:

Las características oceanográficas observada durante el muestreo, no evidencia cambios en la columna de agua cuando las cortinas de burbujas se encuentran activas o inactivas.

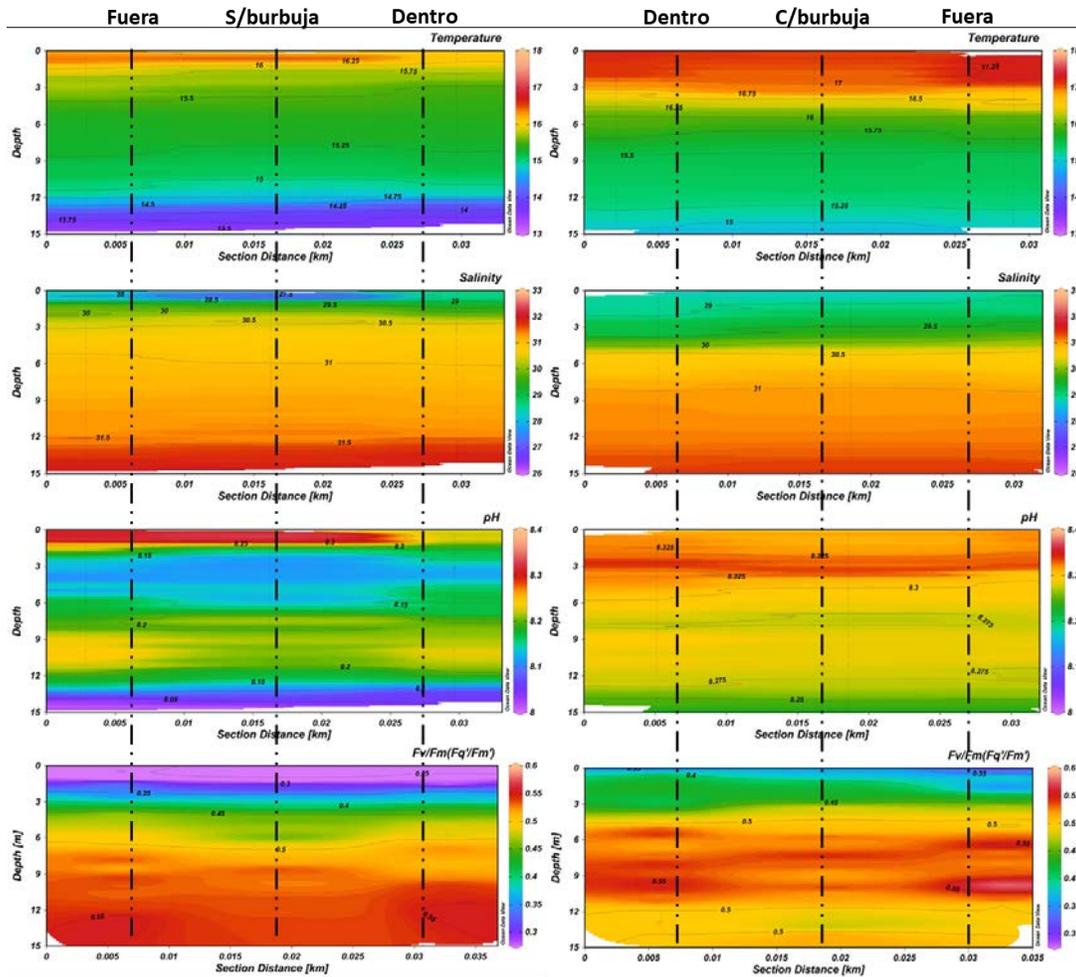
Los perfiles de los lances verticales solo muestran una columna de agua con una baja estratificación (hasta el 1m), posterior a esto se observa que las características físicas son similares dentro del sistema con una temperatura que decrecen levemente a medida que aumenta la profundidad, y que se va relacionando directamente con la salinidad, a medida que se profundiza. Si se relacionamos los perfiles de oxígeno (mL/L) y fluorescencia (mg/m<sup>3</sup>), podemos ver que el máximo pick de fluorescencia se encuentra entre los 9 y 12m para los perfiles obtenidos durante el desarrollo del muestreo.



**Figura 97:** Perfiles oceanográficos obtenidos antes y después de la activación de la cortina de burbujas

En los análisis de contorno se agruparon las estaciones dentro - burbuja y fuera, para observar las condiciones antes y después de la activación de del sistema de burbujeo. Se observó una tendencia similar en el patrón espacial de las variables físicas (temperatura y salinidad), químicas (pH) y eficiencia fotosintética (Fv/Fm) medidas *in situ*. Al analizar solo la estación S/burbuja y C/burbuja, no se observa cambios en ninguna de las variables que pueda indicar que las cortinas actúan eficientemente durante todos los eventos. Cabe señalar que esto corresponde a un muestreo en un periodo acotado de tiempo durante un

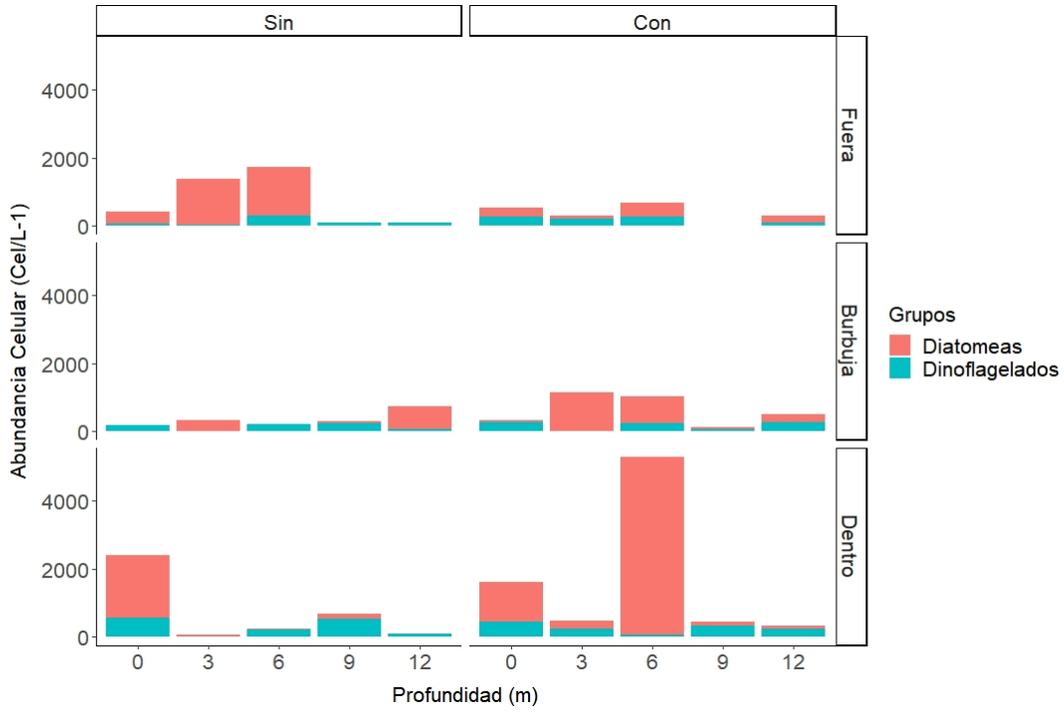
determinado periodo del año, por lo que se requiere realizar más análisis para confirmar la efectividad de este sistema de mitigación en los centros de cultivos de salmónidos.



**Figura 98:** Perfiles oceanográficos de contornos para observa si existen variaciones proyectadas antes (izquierda) o después (derecha) de la activación de la cortina de burbujas.

Se analizó la comunidad fitoplanctónica presente en el sistema. Las muestras fueron colectadas en 3 estaciones similares, primero cuando el sistema de burbujas se encontraba apagado y 30 minutos después de su activación. Las muestras fueron colectadas con un botella Niskin de 5L a profundidades discretas. Los resultados obtenidos muestran que la comunidad al momento del muestreo se encontraba dominada por diatomeas y con bajo número de dinoflagelados. Al realizar los recuentos de microalgas, se determinó que estos se ubican mayoritariamente al interior del sistema de cortinas de

burbujas.



**Figura 99:** Diversidad de organismo fitoplanctónicos dentro del área de estudio y su distribución en tres estaciones antes (Sin) y después (Con) de la activación del sistema de burbujas. Muestras realizadas a profundidades discretas cada 3m desde superficie hasta 12m.

**9.2.4. Principales resultados experimentales**

Apartir de los análisis anteriores, se sintetizaron los resultados de objetivo 1 y 2 en la tabla 10. En los cuales se subdividieron en los siguientes parámetros: condición de aplicación (en base a bibliografía, objetivo 1); Dosis con efecto, dosis óptima (En base a los resultados de eficiencia fotosintética y viabilidad celular de microalgas, objetivo 2); potencial efecto en especies no objetivo (En base a los resultados de líneas celulares branquiales, objetivo 2); validado por; referencia y actualmente en uso para FANs (en base a bibliografía, objetivo 1).

**Tabla 10: Principales de los resultados de las diferentes mitigaciones analizadas.**

Estrategia de mitigación	Condición de aplicación	Dosis con efecto	Dosis óptima	Potencial efecto en especies no objetivo	Validado por:	Referencia	Actualmente en uso para FANs
UV	Cerrado	400-450 kJ/cm <sup>2</sup>	No eficiente	No aplica	Sernapesca	RESA	No
Peroxido de hidrogeno	Cerrado	50 ppm	200 ppm	Si (>50 ppm)	Autoridad marítima/ Subpesca	REPLA	Si
Dioxido de cloro	Cerrado	10000 ppm	No eficiente	Si (>1000 ppm)	Autoridad marítima/ Subpesca	REPLA	No
Arcilla	Abierto	0,1 g/L	1 g/L	Arcilla 1: No Arcilla 2:Si	No	No aplica	No
Macroalgas	Abierto	10 g/L (especie dependiente)	No eficiente	No	No	No aplica	No
Cortinas de burbujas	Abierto	No aplica	No eficiente	No aplica	No	No aplica	Si

### 9.3 Objetivo específico 3

Evaluar la peligrosidad de los productos y sub-productos que se generan de la aplicación de los métodos de mitigación o inactivación celular en diferentes condiciones y escalas de tiempo.

#### 9.3.1. Información sobre peligrosidad de productos y normas internacionales de emisión

Se recopilará información sobre la peligrosidad, normas de emisión y bases internacionales de los productos utilizados en la mitigación de FANs con los respectivos

sub-productos que pudieran formarse al contacto con el agua de mar.

### 9.3.1.1. Peróxido de hidrógeno

#### 1) Antecedentes

En estudios de laboratorio, se ha demostrado que bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) son eficaces principalmente contra microalgas de aguas continentales como las cianobacterias (Barroin y Feuillade, 1986; Drábková et al., 2007; Barrington y Ghadouani, 2008; Randhawa et al., 2012).

En 2009, se aplicó por primera vez  $H_2O_2$  a todo un lago, a una concentración final de  $2 \text{ mg L}^{-1}$ , para suprimir selectivamente un florecimiento de cianobacterias (Matthijs et al., 2012). El peróxido de hidrógeno también se ha explorado como una opción de tratamiento contra los dinoflagelados en el agua de lastre de los barcos (Ichikawa et al., 1992; Bolch y Hallegraeff, 1993; Gregg et al., 2009). La dosis requerida de  $H_2O_2$  varió mucho entre las diferentes especies. Por ejemplo, Ichikawa et al. (1992) informaron que los quistes de *Alexandrium catenella* podían eliminarse de manera efectiva con concentraciones de  $H_2O_2$  de  $30 \text{ mg L}^{-1}$ , mientras que Bolch y Hallegraeff (1993) encontraron que se requerían  $5000 \text{ mg L}^{-1}$  para eliminar los quistes de *Gymnodinium catenatum* del agua de lastre.

#### 2) Peligrosidad de los productos y sub-productos

El  $H_2O_2$  es una especie de oxígeno reactivo (ROS) natural que puede inducir estrés oxidativo en las células, causando daño físico e impactando negativamente en el rendimiento fotosintético de las microalgas. Es producido naturalmente por la fotólisis de la materia orgánica disuelta expuesta a la radiación UV, y también por el fitoplancton como subproducto de la fotosíntesis, la respiración y otros procesos metabólicos.

El  $H_2O_2$  se descompone en agua y oxígeno a través de procesos químicos y biológicos de oxidación-reducción. Esta descomposición ocurre dentro de horas o días dependiendo, por ejemplo, de la actividad biológica, el contenido de materia orgánica y las concentraciones

de metales sensibles a redox como el hierro y el manganeso. Los organismos no objetivo en cuerpos de agua pequeños y confinados podrían verse afectados por el propio  $H_2O_2$  o por radicales hidroxilos reactivos ( $OH^\cdot$ ) formados cuando reacciona con catalizadores metálicos en el agua como el sulfato de hierro (II) (Watts et al., 1999). Esto tendría que ocurrir antes de que el  $H_2O_2$  se descomponga o se diluya a niveles de fondo en el medio ambiente. No se liberan o acumulan contaminantes persistentes en el medio ambiente como resultado de la liberación de  $H_2O_2$  en los ecosistemas acuáticos (Spain et al., 1989; Boyd y Massaut, 1999). El peróxido de hidrógeno descargado en las aguas públicas de la acuicultura intensiva debería diluirse rápidamente y descomponerse simultáneamente hasta que se alcancen los niveles naturales, que en el agua dulce, por ejemplo, oscilan entre 0,001 y 0,109 mg/L (Johnson et al., 1987; Moore et al. 1993). La acción antimicrobiana del peróxido de hidrógeno proviene de su capacidad para formar poderosos oxidantes como el radical hidroxilo y el oxígeno. Estas especies reactivas de oxígeno causan daños irreversibles a componentes celulares como enzimas, constituyentes de membranas y ADN. La gama de subproductos se considera amplia y no está bien caracterizada a nivel detallado. Sería muy difícil proporcionar una metodología analítica para cubrir las concentraciones de bajo nivel de la enorme variedad de estructuras moleculares, incluidos los productos de descomposición. A un nivel de concentraciones prácticas, no se han identificado subproductos de desinfección (DBP -*siglas en inglés*) con relevancia (eco)toxicológica.

### 3) Normas de emisión y bases internacionales

Los siguientes datos se basan en la norma Europea de evaluación de sustancias activas “Peróxido de hidrógeno” N 528/2012. Regulation (EU) No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products.

El peróxido de hidrógeno es tóxico o moderadamente tóxico para los organismos acuáticos; los valores de  $LC_{50}$  en las pruebas con peces oscilan entre 16,4 y 37,4 mg/L, la  $EC_{50}$  de 48 h para invertebrados es de 2,34 mg/L y la  $E_bC_{50}$  para la diatomea marina *Skeletonema costatum* es de 2,39 mg/L. El valor de la concentración sin efecto tóxico (NOEC -*sigla en inglés*) a largo plazo para la reproducción de *Daphnia magna* es de 0,63

mg/l, lo que representa la NOEC crónica más baja para los invertebrados acuáticos, y el valor de la NOEC para *S. costatum* fue de 1,69 mg L<sup>-1</sup>. PNEC<sub>acuatic</sub> es 12,6 µg/L basado en el NOEC de 0,63 mg/L para *Daphnia magna*. La concentración sin efecto proyectada (PNEC – sigla en inglés) para microorganismos de plantas de tratamiento de aguas residuales es de 4,66 mg/L. No se dispone de datos sobre los organismos que habitan en los sedimentos y el suelo y, debido a las propiedades intrínsecas del peróxido de hidrógeno, no se consideran necesarios. La PNEC<sub>suelo</sub> se calculó en 0,0018 mg kg<sup>-1</sup> utilizando el método de reparto en equilibrio. No se prevé que las aves y los mamíferos estén directamente expuestos al peróxido de hidrógeno, por lo que no se considera necesaria una evaluación de riesgos para las aves y los mamíferos.

#### 4) Referencias

Barrington, D.J., Ghadouani, A., 2008. Application of hydrogen peroxide for the removal of toxic cyanobacteria and other phytoplankton from wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 42 (23) 8916–8921.

Barroin, G., Feuillade, M., 1986. Hydrogen peroxide as a potential algicide for *Oscillatoria rubescens* D.C. *Water Res.* 20 (5) 619–623.

Bolch, C.J., Hallegraeff, G.M., 1993. Chemical and physical treatment options to kill toxic dinoflagellate cysts in ships' ballast water. *J. Mar. Environ. Eng.* 1, 23–29.

Boyd, C. E., L. Massaut. 1999. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquaculture Engineering* 20: 113-132.

Drábková, M., Matthijs, H.C.P., Admiraal, W., Marsalek, B., 2007. Selective effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on cyanobacterial photosynthesis. *Photosynthetica* 45 (3) 363–369.

Gregg, M., Rigby, G., Hallegraeff, G.M., 2009. Review of two decades of progress in the development of management options for reducing or eradicating phytoplankton,

zooplankton and bacteria in ship's ballast water. *Aquat. Invasions* 4 (3) 521–565.

Ichikawa, S., Wakao, Y., Fukuyo, Y., 1992. Extermination efficacy of hydrogen peroxide against cysts of red tide and toxic dinoflagellates, and its adaptability to ballast water of cargo ships. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58 (12) 2229–2233 (in Japanese, with English summary).

Johnson, K. S., C. M. Sakamoto-Arnold, S. T. Willason, and C. L. Beehler. 1987. Reagent-injection flow analysis: Application to the determination of nanomolar levels of hydrogen peroxide in seawater. *Analytica Clinica Acta* 201:83-94.

Matthijs, H.C.P., Visser, P.M., Reeze, B., Meeuse, J., Slot, P.C., Wijn, G., Talens, R., Huisman, J., 2012. Selective suppression of harmful cyanobacteria in an entire lake with hydrogen peroxide. *Water Res.* 46 (5) 1460–1472.

Moore, C. A., C. T. Farmer, and R. G. Zika. 1993. Influence of the Orinoco River on hydrogen peroxide distribution and production in the eastern Caribbean. *Journal of Geophysical Research* 98: 2289-2298.

Randhawa, V., Thakkar, M., Wei, L., 2012. Applicability of hydrogen peroxide in brown tide control: culture and microcosm studies. *PLoS ONE* 7 (10) e47844.

Spain, J. C., J. D. Milligan, D. C. Downey, J. K. Slaughter. 1989. Excessive bacterial decomposition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, during enhanced biodegradation. *Ground Water* 27: 163-167.

Watts, R. J., M. K. Foget, S-H. Kong, and A. L. Teel. 1999. Hydrogen peroxide decomposition in model subsurface systems. *Journal of Hazardous Materials* B69: 229-243.

### 9.3.1.2. Dióxido de Cloro

#### 1) Antecedentes

La peroxidación se ha utilizado ampliamente en el pretratamiento de aguas potables, especialmente en aguas de origen que contienen algas (Henderson et al., 2008, Plummer y Edzwald, 2002). Con respecto a otros pre-oxidantes de uso común como el ozono, el cloro, el permanganato de potasio, etc., el ClO<sub>2</sub> no solo posee una gran capacidad oxidante, sino que también presenta una velocidad de reacción más baja con sustancias inorgánicas como los iones bromuro y el nitrógeno amoniacal (Gan et al., 2020; Gan et al., 2019, Zhou et al., 2014). El ClO<sub>2</sub> puede inactivar virus, bacterias y protozoos patógenos de manera efectiva, y controlar el sabor y el olor (Steynberg, 1996; USEPA, 1999). El uso de ClO<sub>2</sub> con una concentración de 1,25–20 mg L<sup>-1</sup> puede transformar más de 50 productos farmacéuticos en aguas residuales (Hey et al., 2012). Además, algunos estudios han verificado que el ClO<sub>2</sub> ha sido efectivo en la eliminación oxidativa de cianotoxinas (Kull et al., 2006; Rodriguez et al., 2007), y la formación de THM podría disminuir significativamente con la pre-oxidación de ClO<sub>2</sub> (Li et al. al., 1996).

#### 2) Peligrosidad de los productos y sub-productos

Varios estudios han mostrado efectos de pH, temperatura y materia suspendida en la acción del dióxido de cloro en diversos organismos y el ambiente. Para el caso del pH, se ha evidenciado que la potencia de inactivación del dióxido de cloro oocistos de *Cryptosporidium* sp. ocurre más rápido a pH 8.0 que a 6.0 (Le Chevallier et al., 1997). Otro estudio mostró que la eficacia del ClO<sub>2</sub> para la desactivación de quistes de *Giardia* sp. incrementa a altos niveles de pH (Liyanage et al., 1997). Por otra parte, la baja temperatura disminuye la efectividad del ClO<sub>2</sub> (Ridenour and Ingols, 1947). Le Chevallier et al. (1997) encontró que al reducir la temperatura de 20 °C a 10 °C se reduce la actividad del ClO<sub>2</sub> en *Cryptosporidium* sp. en un 40% lo cual es similar a otros ensayos previos realizados en *Giardia* sp. y algunos virus. Gregory et al. (1998) encontró que incluso en las más

favorables condiciones (ej., a pH 8.5) la dosis requerida para inactivar *Cryptosporidium* sp. tiene que ser mayor a 3.0 mg L<sup>-1</sup> y a pH neutral la dosis debe superar los 20 mg L<sup>-1</sup>.

Los principales sub-productos del uso de dióxido de cloro son el clorito y clorato los cuales pueden producir anemia hemolítica y otros efectos en la salud. Un gran número de materiales inorgánicos y biológicos pueden reaccionar con el ClO<sub>2</sub> (Noack y Doerr, 1977). Cloro (Cl<sup>-</sup>) y clorito (ClO<sub>2</sub><sup>-</sup>) son las especies dominantes de degradación del ClO<sub>2</sub>, aunque el clorato (ClO<sub>3</sub><sup>-</sup>) puede aparecer por una variedad de razones (Gordon et al., 1990). La reacción redox inmediata con materia orgánica natural es la encargada de la degradación del ClO<sub>2</sub> en clorito en el agua continental (Werdehoff y Singer, 1987). La distribución del clorito y clorato como sub-productos del ClO<sub>2</sub> es altamente influenciada por el pH y la luz solar. Aproximadamente de 50 a 70% del ClO<sub>2</sub> consumido por reacciones oxidativas son convertidas en clorito bajo condiciones de tratamiento. Así, la aplicación de 2 mg L<sup>-1</sup> de ClO<sub>2</sub> deberían producir de 1 a 1.4 mg L<sup>-1</sup> de clorito (Singer, 1992).

### 3) Normas de emisión y bases internacionales

Como consenso general se debe realizar un estudio de la demanda oxidante de un sistema acuático antes de utilizar una dosis establecida de ClO<sub>2</sub>. La norma USEPA 815-R-99-014 indica que para muestras obtenidas de monitoreo de aguas que contengan valores superiores a 0.8 mg L<sup>-1</sup>, muestras adicionales deben ser tomadas al día siguiente para verificación. Si los valores no disminuyen, se debe suspender su utilización. Para el caso del sub-producto clorito, se procede de igual manera que el ClO<sub>2</sub>, pero con un valor de 1.0 mg L<sup>-1</sup>.

*Precaución:* El ClO<sub>2</sub> en gas es explosivo a niveles superiores al 10%.

### 4) Referencias

Gan, W., Ge, Y., Zhu, H., Huang, H., Yang, X., 2019. ClO<sub>2</sub> pre-oxidation changes the yields and formation pathways of chloroform and chloral hydrate from phenolic precursors during chlorination. *Water Res* 148, 250–260.

Gan, W., Ge, Y., Zhong, Y., Yang, X., 2020. The reactions of chlorine dioxide with inorganic and organic compounds in water treatment: kinetics and mechanisms. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 6, 2287–2312.

Gordon, G., et al., 1990. Minimizing chlorite ion and chlorate ion in water treated with chlorine dioxide. *J. AWWA* 82(4), 160 – 165.

Gregory, D., Carlson, K., 1998. Applicability of chlorine dioxide for *Cryptosporidium* inactivation. Proceedings 1998 Water Quality Technology Conference, San Diego, CA.

Henderson, R., Chips, M., Cornwell, N., Hitchins, P., Holden, B., Hurley, S., Parsons, S.A., Wetherill, A., Jefferson, B., 2008. Experiences of algae in UK waters: a treatment perspective. *Water Environ. J.* 22, 184–192.

Hey, G., Grabic, R., Ledin, A., la Cour Jansen, J., Andersen, H., 2012. Oxidation of pharmaceuticals by chlorine dioxide in biologically treated wastewater. *Chem. Eng. J.* 185, 236–242.

Kull, T.P., Sjovall, O.T., Tammenkoski, M.K., Backlund, P.H., Meriluoto, J.A., 2006. Oxidation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by chlorine dioxide: influence of natural organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 40, 1504–1510.

LeChevallier, M.W., et al. 1997. Chlorine dioxide for control of *Cryptosporidium* and disinfection byproducts. Conference proceedings, 1996 AWWA Water Quality Technology Conference part II, Boston, Massachusetts.

Li, J.W., Yu, Z., Cai, X., Gao, M., Chao, F., 1996. Trihalomethanes formation in water treated with chlorine dioxide. *Water Res* 30, 2371–2376.

Liyanage, R.L.J., et al. 1997. Effects of aqueous chlorine and oxychlorine compounds on *Cryptosporidium parvum* Oocysts. Environ. Sci. and Tech. 31(7), 1992 – 1994.

Noack, M.G., Doerr, R.L., 1997. Reactions of chlorine, chlorine dioxide and mixtures of humic acid: An interim report. Conference proceedings, second conference on the environmental impact of water chlorination. R.L. Jolley, H. Gorchev, and D. Heyward (Eds.), Gatlinburg, TN.

Plummer, J.D., Edzwald, J.K., 2002. Effects of chlorine and ozone on algal cell properties and removal of algae by coagulation. J. Water Supply Res. T 51, 307–318.

Ridenour, G.M., Ingols, R.S., 1947. Bactericidal properties of chlorine dioxide. J. AWWA 41, 537.

Rodriguez, E., Onstad, G.D., Kull, T.P., Metcalf, J.S., Acero, J.L., von Gunten, U., 2007. Oxidative elimination of cyanotoxins: comparison of ozone, chlorine, chlorine dioxide and permanganate. Water Res 41, 3381–3393.

Singer, P.C., 1992. Formation and characterization of disinfection byproducts. Presented at the first international conference on the safety of water disinfection: Balancing chemical and microbial risks.

Steynberg, M., 1996. Chlorine and chlorine dioxide: pre-oxidants used as algocide in potable water plants. J. Water SRT-Aqua 45, 162–170.

USEPA, 1999, Alternative Disinfectants and Oxidants Guidance Manual, EPA815-R- 99–014. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC.

Werdehoff, K.S., Singer, P.C., 1987. Chlorine dioxide effects on THMFP, TOXFP and the formation of inorganic by-products. J. AWWA 79(9), 107.

Zhou, S., Shao, Y., Gao, N., Li, L., Deng, J., Zhu, M., Zhu, S., 2014. Effect of chlorine dioxide on cyanobacterial cell integrity, toxin degradation and disinfection by- product formation. *Sci. Total. Environ.* 482, 208–213.

### **9.3.1.3. Radiación Ultravioleta (UV)**

#### **1) Antecedentes**

A diferencia de la mayoría de los desinfectantes, la radiación ultravioleta (UV) no inactiva microorganismos por interacción química. Existe amplia evidencia para concluir que una dosis suficiente de UV interacciona con microorganismos, y puede desinfectar el agua al nivel que sea requerido. Sin embargo, aún existe incertidumbre sobre la eficiencia de este método, sobre todo en aquellos que vinculan microalgas tóxicas. Basado en la literatura existente, parece que la radiación UV actúa de manera eficiente en pequeños microorganismos tales como bacterias y virus, pero las dosis requeridas para actuar eficientemente sobre grandes microorganismos (ej., protozoos, microalgas) debe ser varias veces mayor (White, 1992; DeMers and Renner, 1992). Como resultado de esto, la radiación UV es a menudo utilizada en conjunto a ozono y/o peróxido de hidrógeno.

Las ondas de energía de la radiación UV se encuentran en el rango electromagnético de 100 a 400 nm. La división del UV puede ser clasificado como UV al vacío (100 – 200 nm), UV-C (200 – 280 nm), UV-B (280 – 315 nm) y UV-A (315 – 400 nm). En términos de efecto germicida, el rango de UV óptimo es de 245 a 285 nm. La desinfección por UV utiliza lámparas: de baja presión que emiten una energía máxima a una longitud de onda de 253.7 nm; de media presión que emiten energía a longitudes de onda desde 180 a 1370 nm; o lámparas que emiten otras longitudes de onda en alta intensidad en una modalidad de pulsos.

#### **2) Peligrosidad de los productos y sub-productos**

La radiación UV inactiva organismos debido a la absorción de la luz que causa una reacción fotoquímica que altera los componentes moleculares esenciales para las funciones celulares. A medida que los rayos UV penetran la pared celular de los microorganismos, la energía reacciona con los ácidos nucleicos y otros componentes celulares vitales, resultando en daño o muerte de las células expuestas.

Con relación a la formación de sub-productos, es conocido que la exposición del agua a la radiación UV puede resultar en la formación de ozono o radicales oxidantes (Ellis y Wells, 1941; Murov, 1973). Varios estudios han mostrado que la utilización de radiación UV no produce significantes sub-productos en aguas naturales. Por ejemplo, Malley et al. (1995) expusieron 6 muestras de agua a 3 dosis de UV a 60, 130 y 200  $\text{mW s}^{-1} \text{cm}^2$  sin la detección de picos cromatográficos desconocidos.

### **3) Normas de emisión y bases internacionales**

La desinfección por UV ha sido clasificada como adecuada para la inactivación de virus y bacterias. La mayoría de los virus y bacterias requieren relativamente bajas dosis para su inactivación, típicamente en el rango de 2 a 6  $\text{mW s}^{-1} \text{cm}^2$  (AWWA, 1991). Los protozoos son más resistentes y necesitan una mayor dosis de UV ( $> 82 \text{ mW s}^{-1} \text{cm}^2$ ).

### **4) Referencias**

DeMers, L.D., Renner, R.C., 1992. Alternative disinfection technologies for small drinking water systems. AWWARF.

Ellis, C., Wells, A.A., 1941. The chemical action of ultraviolet rays. Reinhold Publishing Co., New York, NY.

Malley, J.P., Shaw, J.P., Ropp, J.R., 1995. Evaluations of byproducts by treatment of groundwaters with ultraviolet irradiation. AWWARF and AWWA, Denver, CO.

Murov, S.L., 1973. Handbook of photochemistry. Marcel Dekker, New York, NY.

White, G.C., 1992. Handbook of Chlorination and alternative disinfectants. Van Nostrand Reinhold, New York, N.Y.

#### **9.3.1.4. Arcillas modificadas**

##### **1) Antecedentes**

A fines de la década de 1970, se estudió y aplicó la mitigación de FANs utilizando arcillas en las aguas costeras de Kagoshima, Japón (Imai et al., 2006; Shiota, 1989; Yu et al., 1995). Como componente básico del suelo, las arcillas tienen varias ventajas como, por ejemplo, implican un bajo costo, no causan contaminación y son convenientes para usar en el campo. Así, el método de eliminación de microalgas tóxicas mediante arcillas atrajo de inmediato un amplio interés. Actualmente, ha sido uno de los pocos métodos de mitigación de FANs aplicados en el campo. Sin embargo, las arcillas naturales tienen una baja eficiencia floculante, que es el inconveniente más grave que muchas veces lleva a requerir una cantidad exorbitante de arcillas para lograr una eficiencia efectiva en el campo. Como resultado, esto conduce a un mayor impacto ecológico, mayores costos y desafíos logísticos. Por ejemplo, la dosis de arcilla utilizada en algunos sitios de acuicultura en Japón fue de 110–400 t/km<sup>2</sup> (Shiota, 1989), y la dosis de loess utilizada en el control de las floraciones del dinoflagelado *Cochlodinium polykrikoides* en Corea fue de 384 t/km<sup>2</sup> (Anderson et al., 2001). Por lo tanto, la baja eficiencia de remoción, la alta dosificación y las grandes cargas de deposición en los sedimentos constituyen el cuello de botella del método de la arcilla cuando se aplica en el campo (Sengco et al., 2001; Yu et al., 2004; Getchis y Shumway, 2017). Se ha propuesto la teoría de la modificación de la superficie de la arcilla y métodos para mejorar su eficiencia de remoción de microalgas tóxicas desde la columna de agua. Se han preparado varias arcillas modificadas con eficiencias de eliminación que son docenas a cientos de veces mayores que las arcillas naturales no modificadas, y el requerimiento de dosificación resultante se redujo a 4–10 t/km<sup>2</sup>.

## 2) Peligrosidad de los productos y sub-productos

Las arcillas modificadas se han aplicado con éxito a la mitigación de FANs en las aguas costeras de China. Aunque la selección de materiales y la preparación de arcillas modificadas se basan en la consideración de métodos con impactos ambientales adversos mínimos, aún existe la preocupación de que impacten el ecosistema después de su aplicación en el campo. Por lo tanto, se ha prestado mucha atención a los efectos ecológicos de las arcillas modificadas. Se han realizado numerosos estudios al respecto, incluido el seguimiento a largo plazo en el campo después de la aplicación. Recientemente, los resultados de laboratorio y de campo han demostrado que la dosis adecuada de arcilla modificada es capaz de controlar FANs de manera eficiente con efectos negativos insignificantes en los ecosistemas acuáticos y al mismo tiempo lograr una mejora notable en la calidad del agua.

Las arcillas naturales son capaces de reducir los niveles de nutrientes en el agua por adsorción. Yu et al. (1995) investigaron la capacidad de adsorción de diferentes minerales arcillosos sobre nitrato y fosfato. Los resultados mostraron que las arcillas tenían una capacidad de adsorción de fosfato (30 %) mucho mayor que la de nitrato (<6 %), y el caolín, en particular, exhibió una capacidad de adsorción mayor en comparación con la montmorilonita y la tierra de diatomeas. La estructura de la arcilla, particularmente la proporción de Al/Si en las arcillas, es un factor clave que influye en la capacidad de adsorción, de modo que cuanto mayor sea la proporción de Al/Si, más fuerte será la adsorción de fosfato. Además, la modificación de la superficie de las arcillas (mediante modificadores orgánicos) puede aumentar su capacidad de adsorción de FID (fósforo inorgánico disuelto) entre un 25 % y un 50 %, mientras que la capacidad de adsorción de nitrato permanece sin cambios. Además de la adsorción de nutrientes disueltos, la arcilla modificada puede eliminar partículas de nutrientes por floculación durante la mitigación de FANs. Este proceso puede promover cambios a largo plazo en el OD (oxígeno disuelto), con un subsecuente menor metabolismo respiratorio, menor descomposición celular, menor demanda química de oxígeno (DQO) y estabilización del pH.

Los efectos sobre los ambientes béticos de la mitigación de FANs utilizando arcillas han sido motivo de gran preocupación debido al transporte de microalgas tóxicas desde la columna de agua hacia los sedimentos. Algunas de las principales preocupaciones que deben abordarse son las siguientes: (1) si las microalgas productoras de FANs pueden escapar de los flóculos de regreso a la parte superior del agua o formar quistes con potencial de proliferación futura; (2) el destino de las toxinas y su posible acumulación en el bentos; y (3) ¿cuáles son algunos de los principales cambios en el sedimento luego de la mitigación de FANs usando arcillas modificadas?

### **3) Normas de emisión y bases internacionales**

No existen normas para la aplicación de arcillas modificadas para el control de FANs.

### **4) Referencias**

Anderson, D.M., Andersen, P., Bricelj, V.M., Cullen, J.J., Rensel, J.J., 2001. Monitoring and management strategies for harmful algal blooms in coastal waters. UNESCO.

Getchis, T.L., Shumway, S.E., 2017. Harmful algae: an executive summary. Connecticut Sea Grant College Program. CTSG-17-08 (16 pp.).

Imai, I., Yamaguchi, M., Hori, Y., 2006. Eutrophication and occurrence of harmful algal blooms in the Seto Inland Sea, Japan, *Plankton Benthos Res.* 1 (2), 71-84.

Sengco, M.R., 2001. The aggregation of clay minerals and marine microalgal cells: Physiochemical theory and implications for controlling harmful algal blooms. Massachusetts Institute of Technology & Woods Hole Oceanographic Institution.

Shirota, A., 1989. Red tide problem and countermeasures (II). *Int. J. Aquatic. Fish Technol.* 1, 195-223.

Yu, Z., Zou, J.Z., Ma, X., 1995. Application of clays to removal of red tide organisms: the coagulation of kaolin on red tide organism. Chin. J., Oceanol. Limnol. 13, 316-324.

Yu, Z.M., Sengco, M.R., Anderson, D.M., 2004. Flocculation and removal of the brown tide organism, *Aerococcus anophagefferens* (Chrysophyceae), using clays. J. Appl. Phycol. 16 (2), 101 – 110.

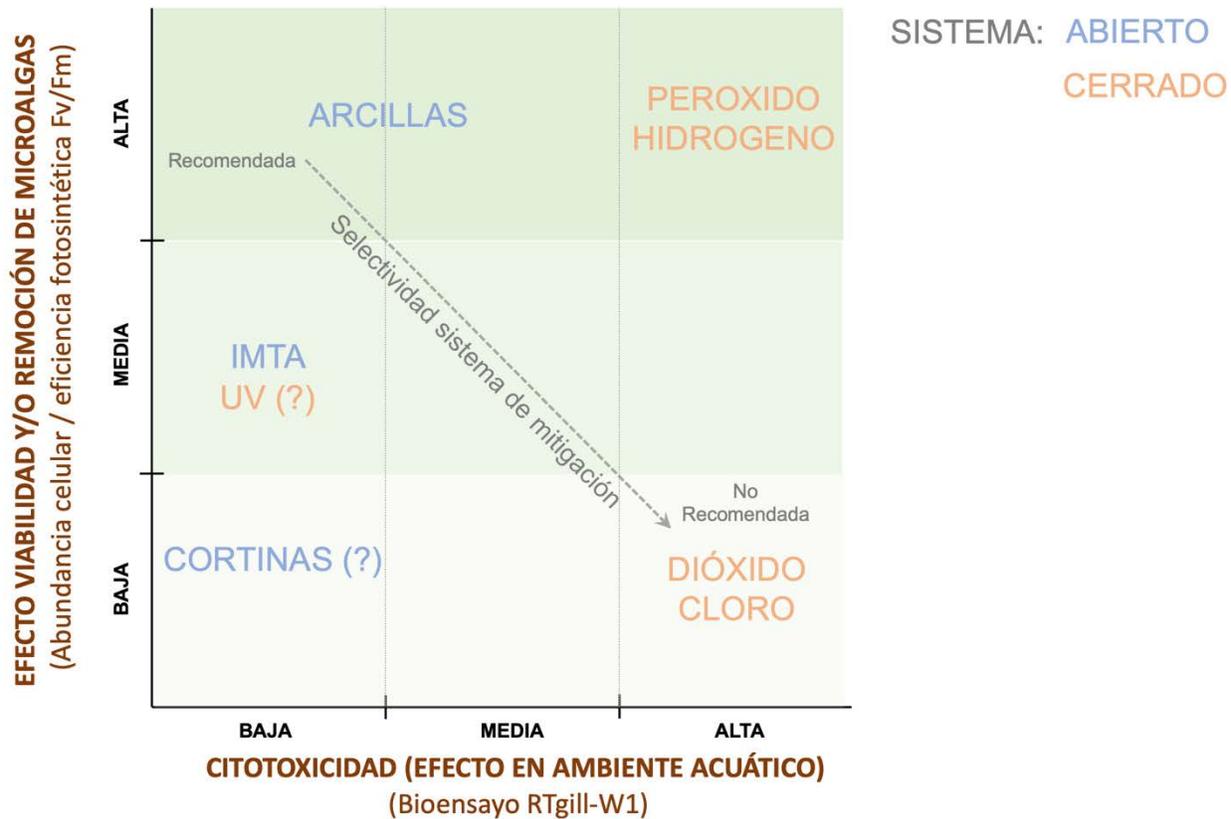
#### **9.3.1.5. Cortinas de burbujas e IMTA**

Para el caso de las cortinas de burbujas e IMTA no existen normas para su aplicación. En el caso de las cortinas de burbujas, no existen estudios publicados acerca de su utilización para la mitigación de FANs. En este informe FIPA se muestran los primeros datos científicos sobre su eficacia durante un bloom, en este caso, de la rafdoficea *H. akashiwo* en 2021 en el fiordo Comau. En el caso del IMTA, no existen estudios sobre su impacto ya que esta metodología se basa en el cultivo de macroalgas ya pertenecientes al entorno natural.

#### **9.3.2. Bioensayos con sistemas de eliminación promisorios:**

En el objetivo 2 de este informe, se encuentran los resultados de evaluación de sistemas de mitigación de FANs utilizando líneas celulares Rtgill-W1. Los sistemas de mitigación evaluados son los siguientes: Arcillas modificadas, peróxido de hidrógeno, dióxido de cloro, macroalgas (IMTA).

## Propuesta de métodos de mitigación para utilizar en Chile



**Figura 100.** Selección de sistemas de mitigación de acuerdo con la efectividad para mitigar microalgas tóxicas y según su impacto en el medio ambiente acuático.

De todos los sistemas de mitigación evaluados, las arcillas modificadas son la metodología que presenta el mayor grado de eficacia para remover microalgas tóxicas con un bajo impacto en el ambiente acuático circundante. Por el contrario, el dióxido de cloro resultó la mediada de mitigación menos eficiente debido a que se necesitan altas dosis para poder generar un efecto en las microalgas. El peróxido de hidrógeno por su parte resulta ser altamente eficiente para remover microalgas, pero a muy bajas dosis es altamente nocivo para el ambiente. Además, este estudio logró determinar que la aplicación de peróxido de hidrogeno en biomásas de algas inocuas estimula la producción de moléculas tóxicas con

larga duración en el ambiente. Se especula que el peróxido de hidrógeno al ser una sustancia reactiva de oxígeno promueve la peroxidación de moléculas lipídicas lo cual puede derivar en la formación de aldehídos tóxicos. Las moléculas exudadas desde macroalgas y la radiación UV tienen un muy bajo impacto en el ambiente, pero su eficiencia para remover microalgas tóxicas es media, lo que probablemente se debe a que ejercen un efecto crónico en las microalgas en vez de uno agudo. Por último, las cortinas de burbujas presentaron un bajo grado de eficiencia para evitar el paso de microalgas tóxicas desde una zona de alta densidad de microalgas hacia el interior de los pontones de cultivos de salmónidos. Este es un importante resultado ya que esta metodología es la más usada en el sur de Chile. Si bien en este proyecto no se pudo determinar su impacto en el medioambiente, se deduce que debe ser bajo ya que las moléculas que ingresan al sistema acuático solo corresponden a aire comprimido y oxígeno disuelto. Sin embargo, se deben realizar estudios en profundidad para determinar si el oxígeno inyectado en la columna de agua puede derivar en peroxidación lipídica, así como se plantea en la utilización del peróxido de hidrógeno (Figura 100).

Finalmente, se recomienda continuar con las investigaciones acerca de los métodos de mitigación, ya que los diseños experimentales solicitados en esta propuesta solo contestan preguntas puntuales. Se necesita definir parámetros ambientales integrales propios de las condiciones in situ para determinar escenarios de aplicación de los diferentes tipos de sistemas de mitigación existentes.

#### 9.4 Objetivo específico 4

Identificar brechas normativas y hacer recomendaciones de las condiciones para la utilización y fiscalización de los sistemas de eliminación en sistemas cerrados y del correcto uso de los sistemas de control en el medio natural, incluyendo una evaluación de volúmenes y costos.

### TIPO DE SISTEMA: ARCILLAS FLOCULANTES MÉTODO MITIGACIÓN: DIRECTOS FÍSICOS

#### 1) Condición de aplicación (asegurar eficacia y bajo impacto ambiental)

- Las arcillas fueron un eficiente agente de mitigación para las especies formadoras de FANs, aunque se observaron respuestas especie específica.
- En los experimentos se utilizaron dos tipos de arcillas y en general la concentración óptima para eliminar especies formadoras de FANs fue de 1 g/L. Esta concentración se mantuvo óptima a pesar de la variación de temperatura y salinidad.
- En este estudio se utilizaron dos tipos de arcilla (caolinitas) y sus efectos de citotoxicidad variaron: Una mostró severos efectos citotóxicos (arcilla 2) y otra fue más inocua (arcilla 1). Además, la arcilla 2 generó una disminución del pH.

Principales resultados que sustentan condición de aplicación:

#### **Eficiencia fotosintética**

Se observaron distintas respuestas de eficiencia fotosintética (EF) de las especies FANs luego de ser tratadas con las arcillas. En general la aplicación de la AR2 generó menores valores de EF que la AR1. Para *A. catenella* la aplicación de una concentración de 0,1 g/L de ambas arcillas generó una severa disminución de la EF comparada con el control tanto a 12°C como 18 °C. En tanto que para *K. selliformis* la aplicación de la misma concentración no tuvo un efecto evidente a 12°C, no obstante, a 18°C hubo una disminución significativa de la EF. Para *P. verruculosa* la exposición a una concentración de 0,1 g/L de AR1 y AR2 a 12°C generó una disminución de la EF, mientras que a 18°C la EF no fue afectada.

#### **Viabilidad celular**

La viabilidad de las especies formadoras de FANs siguió un patrón similar al de la eficiencia fotosintética, es decir, a una concentración de 0,1 g/L se genera una disminución de la respuesta, mientras que a 0,5 g/L se provoca una alta mortalidad de *A. catenella*, *K. selliformis* y *P. verruculosa*. La alta mortalidad a 0,5 g/L se mantiene a pesar de la modificación de la temperatura y salinidad.

#### **Efectos citotóxicos**

Se observaron respuestas citotóxicas contrastantes entre las especies. Así, para el caso

de *A. catenella* la aplicación de arcillas parece disminuir su efecto citotóxico. Mientras que para *K. selliformis* la aplicación de arcillas parece no modificar los efectos citotóxicos, aun cuando es eficiente en generar una alta mortalidad celular. Finalmente, para *P. verruculosa* se observó que a altas concentraciones de arcilla se pueden generar efectos citotóxicos los que podrían ser provocados por la acidificación del medio.

## **2) Recomendación de utilización (Aspectos operativos, salud y protección medio ambiental)**

La evaluación de las arcillas se realizó en laboratorio. Aunque su aplicación no tiene efectos citotóxicos a 0,5 g/L, el incremento de la concentración genera un incremento de la citotoxicidad y una severa acidificación del medio de la arcilla 2. Estos resultados indican que se deben evaluar el tipo de arcilla que se pretende utilizar en relación a los efectos citotóxicos y variación de pH. En este trabajo se utilizó una arcilla caolinita China, no obstante, existen otros tipos de arcillas como zeolitas y diatomitas que deberían ser evaluadas antes de utilizarse.

## **3) Identificación brechas normativas**

Actualmente no hay una normativa asociada al uso de arcillas en Chile. La experiencia extranjera del uso de arcillas particularmente de países asiático indica la concentración a las que se debe usar para ser eficiente y no indica volúmenes máximos y/o efectos en especies no objetivos.

## **4) Recomendaciones condiciones de utilización y fiscalización**

En este estudio se observó que la arcilla potencialmente puede utilizarse para la mitigación de especies formadoras FANs, no obstante, hay que tener las siguientes consideraciones y/o realizar nuevas evaluaciones. 1) Se debe considerar que hay distintos tipos de arcillas las que pueden tener variados efectos citotóxicos y modificación del pH, en consecuencia, las arcillas deben ser evaluadas. 2) Hasta el momento no hay evidencia que muestre los potenciales efectos en el ambiente del uso de arcillas. Por ejemplo, su uso podría afectar a larvas de chorito. En consecuencia, se deben realizar evaluaciones a nivel piloto 3) Su uso podría ser restringido a un evento FANs para evitar la mortalidad de salmones mientras estos son movidos a otras localidades. No se debería usar de manera constante en un centro de cultivo, su uso debería ser solo en casos de emergencias.

## **5) Evaluación de volumen y costo**

En este proyecto se evaluaron arcillas facilitadas por investigadores de China: Dr. Isaac Yongquan Yuan Key Laboratory of Marine Ecology and Environment Science, CAS Institute of Oceanology, CAS Nanhai Rd 7, Qingdao, 266071, China Tel: +86-532-8289-8587. Este es un grupo líder en la generación de arcillas.

Debido a que existen distintos tipos de arcillas y a que su uso *in situ* no ha sido evaluada

es difícil hacer una estimación de volúmenes de uso y costo. No obstante, se puede hacer una estimación general y con altos niveles de incerteza. Si se utilizaran las arcillas modificadas en un centro de cultivo menor, de unos 200.000 mt<sup>2</sup> de superficie (20 há), se necesitarían 2 toneladas del producto por centro.

**TIPO DE SISTEMA: UV**  
**MÉTODO MITIGACIÓN: DIRECTOS FÍSICOS**

**1) Condición de aplicación (asegurar eficacia y bajo impacto ambiental)**

- Los experimentos realizados en condiciones reales mostraron efectos del UV como agente mitigante de especies fitoplactónica sobre los 350 mJ cm<sup>-2</sup>, no obstante, los efectos fueron subletales.
- Aparentemente mayores dosis ( $\geq 500$  mJ cm<sup>-2</sup>) podrían tener un efecto negativo en la viabilidad de las especies FANs como se ha reportado en la literatura (Ver Ficha UV).
- El uso de este método de mitigación es amigable con el ambiente debido que no genera residuos tóxicos.

Principales resultados experimentales:

**Eficiencia fotosintética**

Los experimentos realizados en condiciones reales de uso de un sistema de UV instalado en un barco de Patagonia wellboats mostraron una baja eficacia para la eliminación de fitoplancton. Actualmente la normativa nacional indica que para el tratamiento de enfermedades como el virus ISA se debe utilizar una dosis UV de 90 mJ cm<sup>-2</sup>. Cuando utilizamos una dosis cercana a ese valor no se observaron efectos sobre la eficiencia fotosintética lo que indica que la comunidad fitoplactónica no fue afectada por la mitigación. Debido a esto, progresivamente se fue incrementando la dosis para la mitigación del fitoplancton llegando a valores de 450 mJ cm<sup>-2</sup>. La evaluación de la eficiencia fotosintética no vario sustantivamente cuando se comparó con el control. Estos resultados sugieren que la aplicación de UV como técnica de mitigación tiene una baja eficiencia. Es importante indicar que esta es la primera vez que se realiza la evaluación en condiciones de uso real de un sistema de UV en Chile instalado en los Patagonia wellboats.

**2) Recomendación de utilización (Aspectos operativos, salud y protección medio ambiental)**

El uso de luz UV es uno de los más amigables con el ambiente debido a que su uso es acotado a las especies objetivo de mitigar.

La evaluación del efecto de altas dosis de UV sobre la comunidad fitoplactónica reveló efectos subletales. No obstante, es necesario medir efectos crónicos como la imposibilidad de crecer de las especies que forman FANs y la incapacidad de generar toxinas debido a posibles efectos de mutación.

### **3) Identificación brechas normativas**

Para aprobar el uso de medidas de mitigación a través del uso de sistemas UV, se deben realizar más experimentos condiciones de uso real y evaluar posibles efectos crónicos.

### **4) Recomendaciones condiciones de utilización y fiscalización**

Posiblemente mayores dosis a las usadas en los experimentos que realizamos podrían generar efectos negativos en las especies FANs, pero es necesario evaluarlas.

### **5) Evaluación de volúmen y costo**

No es posible realizar la evaluación de volúmenes y costos debido a que se observaron efectos subletales del uso de UV sobre las especies formadoras de FANs. Futuros experimentos deberían evaluar mayor intensidad de dosis y efectos crónicos como mutaciones e inhibición del crecimiento.

Respecto a evaluaciones económicas estas son difíciles de estimar debido a las cambiantes condiciones del mercado. En Puerto Montt la empresa Atlantium es líder en la venta de sistemas de UV para wellboat, plantas procesadoras, etc. Adjuntamos los datos de su representante para su contacto y actualización de precios de prestación de servicio UV. Mauricio Díaz Barraza. Gerente Ventas Chile +56 9 799 921 23 [www.atlantium.com](http://www.atlantium.com). [mauricio@atlantium.com](mailto:mauricio@atlantium.com)

## **TIPO DE SISTEMA: CORTINA BURBUJA MÉTODO MITIGACIÓN: DIRECTOS FÍSICOS**

### **1) Condición de aplicación (asegurar eficacia y bajo impacto ambiental)**

- La evaluación de las cortinas de burbuja en terreno reveló que tienen una baja eficiencia como pared física para limitar el movimiento de células fitoplactónica.

### **Principales resultados experimentales:**

La evaluación del desempeño de las cortinas de burbuja como medida de mitigación de eventos de FANs se evaluó en dos localidades, las que tuvieron distintas características oceanográficas, meteorológicas y de composición de la comunidad fitoplactónica. No

obstante, las respuestas de eficiencia fotosintética y variación de densidad fitoplactónica fueron similares a través de las estaciones de muestreo (dentro de centros de cultivo; sobre la cortina de burbuja y fuera de la cortina de burbuja).

## **2) Recomendación de utilización (Aspectos operativos, salud y protección medio ambiental)**

Los resultados mostraron una baja eficiencia de las cortinas como mitigante de FANs, en consecuencia, no es posible hacer recomendaciones de uso. Se hace necesario realizar nuevos estudios modificando variables como intensidad de flujo de aire, profundidad de instalación, para verificar si estos cambios pueden incidir en su eficacia como métodos mitigantes.

## **3) Identificación brechas normativas**

Actualmente en Chile se aplican las cortinas de burbuja como agente mitigante de FANs. No obstante, fue complejo entender cómo se llevó a cabo esta aprobación. Se debe trabajar en el desarrollo de un reglamento que describa de manera amigable para los usuarios como las distintas entidades relacionadas directa o indirectamente en el manejo y control de FANs participan en este tipo de toma de decisiones, así como sus competencias.

## **4) Recomendaciones condiciones de utilización y fiscalización**

Se recomienda evaluar nuevas variables como profundidad de instalación y flujo de aire inyectado.

## **5) Evaluación de volúmen y costo**

Actualmente existen algunas empresas que prestan el servicio de instalación de cortinas de burbuja en centros de cultivo. Por ejemplo, podemos nombrar a: ppsoluciones (<https://www.ppsoluciones.cl/>). Los volumen y evaluación de costos son complejos de estimar debido a las cambiantes condiciones del mercado.

### **TIPO DE SISTEMA: PEROXIDO HIDRÓGENO MÉTODO MITIGACIÓN: DIRECTOS QUÍMICOS**

#### **1) Condición de aplicación (asegurar eficacia y bajo impacto ambiental)**

- La evaluación del peróxido de hidrogeno mostró que el uso en una concentración de 200 ppm es óptima para afectar la viabilidad y eficiencia fotosintética de todas las especies formadoras de FANs. Aunque, hay que considerar que también se

observaron respuestas especie específica, es decir, algunas especies pueden presentar valores de baja viabilidad y eficiencia fotosintética a concentraciones menores de 200 ppm de peróxido de hidrogeno.

- El uso del peróxido de hidrogeno en la condición optima (200 ppm) genera severos efectos citotóxicos tal como lo reveló la evaluación de viabilidad celular de líneas celulares branquiales. Estos efectos citotóxicos podrían afectar a otras especies que se encuentran en el agua.

## **Principales resultados:**

### **Eficiencia fotosintética**

Los resultados obtenidos en laboratorio mostraron que la exposición de *A. catenella*, *K. selliformis* y *P. verruculosa* a una concentración de peróxido de hidrogeno 50 ppm, en concentraciones celulares de 100 y 1000 cel./mL, produce una inmediata disminución de la eficiencia fotosintética (EF) (tiempo 0). Luego de 30 minutos de exposición la EF disminuye significativamente. Este patrón fue similar aun cuando se modificaron las temperaturas (12 y 18 °C) y salinidad (25 y 33 PSU). Al aumentar las concentraciones hasta 200, 500 y 1000 ppm de peróxido de hidrogeno la disminución de la EF fue más severa en el tiempo 0. En general las especies FANs evaluadas tuvieron respuestas de EF similares.

### **Viabilidad celular**

La evaluación de la viabilidad celular mostró algunas diferencias entre las especies. La exposición de *A. catenella* al peróxido de hidrogeno en concentraciones de 50 y 100 ppm, y con variación de salinidad, temperatura y densidad celular, mostró valores en promedio de viabilidad en un rango entre 0 y 50 %. En las mismas condiciones experimentales *K. selliformis* mostró valores de 0 % de viabilidad y *P. verruculosa* valores en un rango entre 0 y 22 %. En concentraciones más altas de peróxido de hidrogeno 200, 500 y 1000 ppm la viabilidad celular de las especies FANs fue de 0 % mayoritariamente.

### **Efectos citotóxicos**

La evaluación del efecto citotóxico luego de aplicación de peróxido de hidrogeno mostró valores bajos alcanzado de aproximadamente 26% de viabilidad luego de aplicar concentraciones de peróxido de hidrógeno de 50 y 100 ppm. La viabilidad celular baja progresivamente alcanzando un porcentaje de cero % en una concentración de 1000 ppm.

## **2) Recomendación de utilización (Aspectos operativos, salud y protección medio ambiental)**

Se recomienda utilizar el peróxido de hidrogeno en concentraciones de 200 ppm. Esta concentración genera efectos mortales en las células de especies formadoras de FANs aun cuando exista variación de la temperatura, salinidad y densidad celular.

Se debe considerar que a esta concentración especies no objetivo de mitigación pueden ser afectadas negativamente.

## **3) Identificación brechas normativas**

Actualmente, no existe una evaluación de los posibles efectos que podría tener la aplicación de peróxido de hidrogeno en especies que no son objetivo de mitigación. Además, se desconoce el tiempo de degradación del biocida luego de ser utilizado o desechado al ambiente. Este tipo de evaluación podría incluirse en la normativa.

#### **4) Recomendaciones condiciones de utilización y fiscalización**

Se debería medir las concentraciones residuales luego de aplicar el biocida con el objetivo de verificar posibles efectos negativos en especies que no son objetos de mitigación.

#### **5) Evaluación de volúmen y costo**

La evaluación del efecto del peróxido de hidrogeno sobre la especie FANs se realizó a nivel de laboratorio, en consecuencia, es difícil establecer costo y volumen de uso real. Esto se debe a que el escalamiento de la aplicación de una medida de mitigación a nivel real, incluye variables y actividades que no fueron medidas en este proyecto. Por ejemplo, existen costos asociados al transporte (terrestre y marítimo), manejo de reactivo en terreno, almacenaje de reactivos, etc. Además, pueden existir más de una empresa que provea el biocida a distintos costos. Por otro lado, el volumen de agua que se va a mitigar puede determinar el costo del proceso de mitigación.

### **TIPO DE SISTEMA: DIÓXIDO DE CLORO MÉTODO MITIGACIÓN: DIRECTOS QUÍMICOS**

#### **1) Condición de aplicación (asegurar eficacia y bajo impacto ambiental)**

- Los experimentos realizados en laboratorio mostraron que se necesita una alta concentración de dióxido de cloro (10.000 ppm) para que sea eficaz como biocida. Para alcanzar esta concentración se necesita un alto volumen del reactivo llegando a una proporción de 1:1 de muestra a mitigar y de agente mitigante. A una concentración de 10.000 ppm se generan severos efectos citotóxicos observándose una viabilidad celular de 0 por ciento. Debido a esto, la aplicación del dióxido de cloro tendría un alto efecto citotóxico en especies que no son objetivo de la mitigación y alto impacto ambiental.
- Sin embargo, hay que considerar que podría existir variación en eficiencia de los biocidas ya que existen antecedentes que muestran que a una concentración 20 ppm fue suficiente para destruir células de *A. catenella* (Ver Ficha Dióxido cloro).

#### **Principales resultados Eficiencia fotosintética**

La aplicación de dosis desde 1 hasta 100 ppm de dióxido de cloro no afectó sustantivamente la eficiencia fotosintética de las especies formadoras de FANs, indicando

una baja eficacia como agente mitigante. Al aumentar las dosis hasta 1000 y exponer las células por 0, 30 y 60 minutos se observaron resultados distintos entre las especies.

### **Efectos citotóxicos**

En relación al efecto del dióxido de cloro sobre líneas celulares branquiales se observó que la concentración de 1000 ppm afecta severamente la viabilidad llegando a un 20%. Cuando se sube la concentración a 10.000 ppm, la viabilidad es de 0%. A pesar de lo anterior, la aplicación de dióxido de cloro como agente mitigante a una concentración de 10.000 ppm en condiciones de uso real sería inviable. Esto se debe a que para alcanzar esa concentración se tuvo que adicionar un volumen casi igual al de la solución con células de especies FANs, es decir la proporción fue casi de 1:1. Además, el severo efecto en la línea branquial, observado en concentraciones de 1000 ppm y 10000 ppm indican que su uso en esos rangos podría afectar, por ejemplo, los peces en cultivo.

## **2) Recomendación de utilización (Aspectos operativos, salud y protección medio ambiental)**

En la literatura se ha descrito que una concentración 20 ppm fue suficiente para destruir células de *A. catenella* (Ver Ficha Dióxido cloro). En contraste nuestros resultados mostraron que una concentración de 10.000 ppm fué necesaria para generar mortalidad de especies FANs. Estas diferencias podrían deberse a que las características del reactivo, es decir, hay algunos que podrían ser más sensibles a la degradación.

## **3) Identificación brechas normativas**

Actualmente, no existe una evaluación de los posibles efectos que podría tener la aplicación del dióxido de cloro en especies que no son objetivo de mitigación. Además, se desconoce el tiempo de degradación del biocida luego de ser utilizado o desechado al ambiente. Estas evaluaciones podrían incluirse en la normativa.

## **4) Recomendaciones condiciones de utilización y fiscalización**

Se debería medir las concentraciones residuales luego de aplicar el biocida con el objetivo de verificar posibles efectos negativos en especies que no son objetos de mitigación.

## **5) Evaluación de volúmen y costo**

No es posible realizar la evaluación de volúmenes y costos debido a que los efectos significativos de mortalidad sobre las especies formadoras de FANs fueron obtenidos en concentraciones muy altas de dióxido de cloro (10.000). El uso de esa concentración en condiciones reales es imposible debido al alto volumen de reactivo que se necesitaría.

**TIPO DE SISTEMA:** ACUICULTURA MULTITRÓFICA INTEGRADA (IMTA. ACRÓNIMO

INGLES: INTEGRATED MULTI-TROPHIC AQUACULTURE)  
**MÉTODO MITIGACIÓN: DIRECTOS BIOLÓGICO**

**1) Condición de aplicación (asegurar eficacia y bajo impacto ambiental)**

- Los resultados de los experimentos de co-cultivo (flujo abierto y mesocosmo) mostraron que podrían existir efectos alelopáticos de las macroalgas sobre las especies FANs y comunidad fitoplactónica que produzcan mortalidad. Aunque, hay que considerar que los efectos negativos fueron especie específico.
- Interesantemente se observó que el co-cultivo de una especie altamente citotóxica como *K. selliformis* con macroalgas produjo la disminución de la citotoxicidad.
- Se observó un incremento del pH en el estanque al mantener las macroalgas en cultivo con las especies FANs. El aumento de pH es un fenómeno que se produce por la actividad fotosintéticas de las macroalgas que incluyen la fijación de CO<sub>2</sub>. El incremento de pH puede afectar el crecimiento de especies nocivas.

**Principales resultados:**

**Eficiencia fotosintética**

La evaluación de la eficiencia fotosintética no mostró cambios sustantivos en el experimento de co-cultivo de flujo abierto. Aunque en el experimento de mesocosmo la eficiencia fue severamente afectada.

**Viabilidad Celular**

El co-cultivo generó la disminución de la densidad y viabilidad celular para ciertas especies formadoras de FANs en comparación con el control. Así, la viabilidad y densidad celular de *A. catenella* disminuyo cuando se mantuvo en cultivo con *Macrocystis* y *Ulva*. Aunque, al ser mantenida junto a *Agarophyton* no se observaron cambios. Por el contrario, la viabilidad y densidad de *K. selliformis* disminuyo al ser cultivada con *Agarophyton*. No obstante, luego de 24 horas de cultivo con las macroalgas la viabilidad y densidad celular de *K. selliformis* bajo. Para el caso de *P. verruculosa* no se observó una disminución significativa de la viabilidad y densidad celular luego de mantenerla en cultivo con las distintas especies de macroalga y por distintos tiempos de exposición. En tanto que en el experimento de mesocosmo la viabilidad de la comunidad fitoplactónica fue severamente afectada y solo se registraron algunas diatomeas vivas.

**Efectos citotóxicos**

Respecto a los efectos citotóxicos se observaron respuestas especie específicas. En el control de *A. catenella* se observaron efectos citotóxicos al coleccionar muestras tanto dentro del frasco de cultivo como desde el estanque de cultivo, indicando que las ictiotoxinas pueden difundir a través del frasco hacia el estanque. Al mantener a *A. catenella* en cultivo con macroalgas no se observaron diferencias en los efectos citotóxicos respecto al control. Por el contrario el control de *K. selliformis* mostró que las muestras tomadas desde el frasco de cultivo generaron severos efectos citotóxicos. Posiblemente estas toxinas no fueron

capaces de difundir hacia el estanque debido a que la muestra tomada en este no generó una disminución de la viabilidad de las células branquiales. Interesantemente, al mantener en cultivo a *K. selliformis* con todas las macroalgas se observa un aumento de la viabilidad de células branquiales lo que indicaría que el co-cultivo es eficaz para disminuir la citotoxicidad de *K. selliformis*. Para el caso de *P. verruculosa* no se observaron efectos citotóxicos.

## **2) Recomendación de utilización (Aspectos operativos, salud y protección medio ambiental)**

Las evaluaciones experimentales en este proyecto se realizaron en laboratorio y fueron implementadas de forma tal de replicar condiciones reales de uso. Por ejemplo, se usaron flujos continuos de agua y mesocosmo. Aun cuando los resultados muestran que el co-cultivo tiene potencial para ser utilizado como mitigante de especies FANs es necesario realizar evaluación a nivel piloto para tener evidencia más robusta de los efectos.

Es importante mencionar que uso de algas es ambientalmente amigable ya son capaces de: fijar CO<sub>2</sub> y consumir los nutrientes. Ambas características son importantes en un contexto de cambio climático y eutrofización.

## **3) Identificación brechas normativas**

Actualmente los cultivos en un modelo de "acuicultura multitrófica integrada" se han realizado de forma experimental, en consecuencia, no hay normativa asociada.

## **4) Recomendaciones condiciones de utilización y fiscalización**

Futuras evaluaciones deberían considerar el uso de la "acuicultura multitrófica integrada" y los posibles efectos negativos que podría tener para el cultivo de mitilidos. Esto debido a que los efectos alelopáticos de las macroalgas podrían afectar a la comunidad fitoplactónica en general. No obstante, para el cultivo de salmones el uso de cultivo integrado parece ser más promisorio.

## **5) Evaluación de volúmen y costo**

No se puede realizar una estimación de volumen y costos sin tener previamente una evaluación a nivel piloto.

**Tabla 11.** Muestra las principales instituciones y sus funciones que están relacionadas con el control, mitigación, y prevención de los efectos nocivos de las mareas rojas.

<p><b>SUBSECRETARIA DE PESCA Y ACUICULTURA (SUBPESCA)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Declara las especies plaga y categoriza los sectores afectados (según: Reglamento de Plagas Hidrobiológicas D.S. (Minecon) N° 345)</li> <li>- Vigila las microalgas nocivas para la salud humana: <i>Alexandrium catenella</i>, <i>Alexandrium ostenfeldii</i>, <i>Dinophysis acuta</i>, <i>Dinophysis acuminata</i>, <i>Protoceratium reticulatum</i>, <i>Pseudo nitzschia</i> cf. <i>Australis</i> y <i>P.</i> cf. <i>Pseudodelicatissima</i>. Monitoreo de especies (Fiordos y Pacífico) mandatados por esta Subpesca y ejecutados por el Instituto de Fomento Pesquero (IFOP), en el marco del Título VII de la Ley General de Pesca y Acuicultura.</li> <li>-Mandata el Programa de manejo y monitoreo de las mareas rojas en el sistema de fiordos y canales de Chile, y el programa de manejo y monitoreo de floraciones algales nocivas y toxinas marinas en el océano Pacífico del centro sur de Chile (36°-44° S). Ambos ejecutados por el instituto de Fomento Pesquero (IFOP).</li> </ul>	<p><b>MINISTERIO DE SALUD</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Programa nacional de control y prevención de intoxicaciones por marea roja. Ejecutado a través de los Laboratorios de las Seremi de Salud de todo el país y el Instituto de Salud Pública (análisis de 40.000 muestras de mariscos al año). Objetivo, descartar la presencia de toxinas y de esta forma prevenir posibles intoxicaciones de la población, derivadas del consumo de recursos marinos tóxicos, producto de floraciones de algas nocivas. En base a esta información Minsal declara las áreas afectadas por toxinas marinas y ordena las prohibiciones de extracción, comercialización y transporte de los sectores antes señalados.</li> </ul>
<p><b>ARMADA DE CHILE DIRECCIÓN GENERAL DEL TERRITORIO MARÍTIMO Y DE MARINA MERCANTE (DIRECTEMAR)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Cautela el cumplimiento de la normativa nacional y acuerdos internacionales vigentes, con el fin de preservar los ambientes y ecosistemas acuáticos conformados por mar, ríos y lagos navegables, dar respuesta y controlar los eventos de contaminación con el propósito de propender a la protección del medio ambiente acuático, minimizando los efectos de la contaminación y de otros impactos ambientales, a través de actividades como la fiscalización y monitoreo.</li> <li>-Adoptar las medidas preventivas que eviten el daño al medio ambiente acuático, a través de la evaluación y regularización del uso de desinfectantes, detergentes, antiparasitarios, dispersantes y absorbentes de hidrocarburos y otros productos químicos en la jurisdicción de la Autoridad Marítima.</li> <li>-Con la finalidad de asegurar que los productos que se usen en jurisdicción de la Autoridad Marítima no sean perjudiciales para el ambiente acuático, se aprueba la Resolución D.G.T.M. Y M.M. ORDINARIO N° 12600/6, de fecha 08 de enero de 2020 (Circular Marítima N° A-52/008), que establece los requisitos para solicitar la autorización de uso de químicos en la jurisdicción de la Autoridad Marítima.</li> </ul>	<p><b>SERVICIO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA (SERNAPESCA)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Programa Sanidad de Moluscos Bivalvos (PSMB). Es obligatorio para los productos bentónicos destinados a mercados internacionales. Actualmente existen 121 áreas PSMB, 3 en la región de Coquimbo, 1 en la región del Biobío, 1 en la región de Los Ríos XIV y 116 en la región de Los Lagos, a quienes se les exige entre otros monitoreo de toxinas marinas y fitoplancton. En base a la información generada por este programa, Sernapesca autoriza la comercialización de productos hacia los mercados internacionales.</li> <li>- Registro de las floraciones de algas nocivas para la acuicultura mediante Resolución exenta N° 2198 de 2017 (implementada desde el 2017), la cual exige a los titulares de los centros de cultivo de salmonidos informar cuando en sus monitoreos de fitoplancton, las microalgas sobrepasen los límites referenciales de nocividad.</li> <li>- Programa de vigilancia y control de <i>Alexandrium catenella</i>. resolución exenta N° 519/2022 <a href="http://www.sernapesca.cl/normativa-relacionada/res-ex-ndeg-519-10032022-modifica-medidas-de-la-resolucion-exenta-ndeg">http://www.sernapesca.cl/normativa-relacionada/res-ex-ndeg-519-10032022-modifica-medidas-de-la-resolucion-exenta-ndeg</a>, mediante el cual se controla la presencia de <i>Alexandrium catenella</i> en las bodegas de los wellboat que transportan cosecha viva desde las regiones de Aysén y Magallanes a las plantas de proceso de a la región de Los Lagos.</li> </ul>

La actual normativa identifica las competencia y rol de distintas instituciones relacionadas con el monitoreo de algunas especies FANs, monitoreo de toxinas para prevenir efectos en la salud humana (Tabla 11). Estas instituciones han mostrado una alta eficiencia en estas temáticas, ya que a pesar de que el sur de Chile está afectado continuamente por FANs, que cubren extensas zonas geográficas, los efectos nocivos en humanos y/o mortalidades asociadas han sido bajas. No obstante, la normativa relacionada con y

agentes o técnicas de mitigación aun es insipiente y a veces es complejo diferenciar las pertinencias de algunas instituciones. En este contexto se recomienda avanzar en generación de normativas que reglamente de forma clara los protocolos de evaluación incluyendo la afectación de microalgas marinas y los potenciales efectos en especies no objetivos de mitigación. Aun cuando podemos realizar algunas propuestas de evaluación estas deberían ser discutidas y consensuadas con un grupo más diverso de expertos en el tema y con entidades asociadas en temas productivos. Entre las sugerencias se incluyen: A) Diferenciar de forma clara las competencias de las instituciones en temáticas de mitigación su evaluación y aprobación; B) Diseñar experimentos que den cuenta de los efectos de los biocidas y técnicas de mitigación a nivel de la especie que se quiere mitigar, como también en especies no objetivo, C) acoplar distintos métodos de mitigación para lograr una inactivación de especies FANs más eficaz. D) Realizar evaluaciones *in situ* de los efectos de los sistemas de mitigación y biocidas.

## 10. CONCLUSIONES

**Objetivo específico 1** Describir y comparar los sistemas de mitigación o inactivación decélulas de microalgas tóxicas a nivel mundial para evitar su dispersión y efectos nocivos y/o tóxicos en ambientes naturales con el fin de seleccionar los métodos que pudieran adaptarse a las necesidades nacionales.

### Recopilación de información

La búsqueda, revisión e indexación de la bibliografía relacionada con los sistemas de mitigación estuvo distribuida en una mayor cantidad en artículos de investigación (96 artículos) y en menor medida en libros (4), columnas de opinión (4), informes técnicos (3) y poster presentados en congresos (2). A pesar de que los artículos de investigación representan información robusta, una gran cantidad estos trabajos muestran solo

evaluaciones de laboratorio y/o piloto, sin embargo, son limitadas las evaluaciones de mitigaciones en terreno a escala real.

### **Confección de fichas**

La revisión bibliográfica reveló una gran cantidad de métodos de mitigación que incluyen aproximaciones físicas, químicas y biológicas. Sin embargo, los métodos de mitigación que emplean dióxido de cloro, peróxido de hidrógeno, arcillas modificadas, burbujeo y cultivos integrados, estuvieron representados por una mayor cantidad de trabajos.

### **Comparación de sistemas de mitigación**

La comparación de sistemas de mitigación mostró una mayor cantidad de información para *A. catenella*, seguida de *K. selliformis* y en menor medida para *Pseudochattonella verruculosa*. Adicionalmente, la estimación de costos asociados a los sistemas de mitigación no es factible de realizar debido a: la inexistencia de información acerca de las dosis efectivas de mitigación por especie de microalga y del impacto ambiental a corto, mediano y largo plazo principalmente entre otros factores.

### **Selección de sistemas**

De manera preliminar y considerando la revisión bibliográfica se seleccionaron los sistemas de mitigación de burbujeo por surgencia y aplicación de luz UV. Posterior a las mediciones en terreno y laboratorio, se evaluarán nuevos criterios de selección a partir de la información producida. Esto permitirá saber que sistema utilizar para las especies de microalgas tóxicas de interés en Chile.

### **Sistematización de normativa**

La comparación de normativa evidencia problemas transversales relacionados con el

establecimiento de biocidas y sus determinadas dosis para ser aplicados en la tarea de mitigar especies FANs. Esto puede deberse a las escasas evaluaciones en condiciones reales, y a las diferentes respuestas que tienen distintas especies que producen FANs cuando son mitigadas con un determinado biocida.

**Objetivo específico 2** Realizar experimentos multifactoriales in vitro con al menos tres sistemas de control diferentes, utilizando al menos tres microalgas tóxicas chilenas, para cuantificar el efecto sobre las microalgas y sobre la concentración de toxinas en el agua.

Una gran variedad de métodos de mitigación de FANs es usada en el mundo con diferentes resultados, los cuales están dados por la especie de microalga a tratar y por las condiciones físico-químicas del ambiente. Un aspecto muy relevante, y que los estudios en general han dejado de lado, son los efectos secundarios que estos tratamientos de mitigación pueden provocar en el ambiente acuático. Por ejemplo, la cloración de agua con propósitos de su potabilización es frecuentemente utilizada para eliminar cianobacterias.

Desafortunadamente, aunque las cianobacterias son lisadas por la cloración, las toxinas intracelulares pueden ser liberadas al medio, con alguna susceptibilidad a la oxidación más que otras toxinas (saxitoxina > cilindrospermopsina > microcistina; Zamyadi et al., 2012), permitiendo que estas toxinas permanezcan en aguas tratadas para consumo (Carmichael, 2008).

### **Dióxido de cloro**

1. En este estudio el uso de dióxido de cloro no resultó efectivo para la mitigación de las especies objetivo de este estudio ya que se requieren grandes dosis para su función como inactivador celular microalgal. Este resultado discrepa, por ejemplo, con Gregg et al., (2009) que indica que células vegetativas de microalgas pueden mostrar 100 % de mortalidad con solo dosis de dióxido de cloro que van desde 3 a 25 ppm en un rango de tiempo de 30 a 120 min. El dióxido de cloro reacciona con

aminas terciarias y sistemas aromáticos inactivados, por lo que su uso es regulado a mínimas dosis para prevenir la acumulación de clorito y clorato como subproductos tóxicos (Rodríguez et al., 2007).

El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ha sido efectivo en la reducción de cianobacterias y microcistinas en estudios de laboratorio, siendo las cianobacterias reemplazadas por eucariotas (ej., Barroin & Feuillade, 1986; Barrington et al., 2013). Compuestos derivados de los peróxidos que producen radicales libres han sido usados en contra de *Planktothrix perornata*, una cianobacteria que produce sabor a barro en ciertos peces cultivados en agua dulce (Nanayakkara & Schrader, 2011). En ambientes naturales, *Planktothrix agarghi* fue eliminada del lago Louise Anita en Meryland, estados Unidos y del lago Koetshuis en Holanda, usando 3 (Mattheiss et al., 2017) y 2 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> (Matthijs et al., 2011) respectivamente, con un impacto bajo en la biota según se reportó. Contrariamente a los resultados reportados por Matthijs et al. (2011), se reportó que 44 – 95 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> generaron efectos negativos en poblaciones de crustáceos (Barrington et al., 2013). En una aproximación similar a estos tratamientos, en el arroyo Ouwerkerkse en Holanda, células vegetativas y quistes temporales de *Alexandrium ostenfeldii* fueron destruidos con la adición de 50 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, con una reducción de las toxinas paralizantes, con un mínimo impacto en invertebrados y peces, pero con susceptibilidad por parte del zooplancton (Burson et al., 2014). Otros ejemplos incluyen; rápido decline de poblaciones de *Cochlodinium sp.* en la bahía de Kagoshima en Japón luego de la adición de 30 ppm de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y entre 10 a 100 ppm para un efecto negativo en el enquistamiento de *Polykrikos schwartzii* y *A. catenella* (Ichikawa et al., 1992 en NOWPAP CEARAC, 2007), y 2) la lisis celular de *Chattonella marina* a concentraciones de peróxido entre 15 y 150 ppm (Murata et al., 1989 en NOWPAP CEARAC, 2007).

### **Peróxido de hidrogeno**

2. En este estudio el uso de peróxido de hidrógeno resultó ser efectivo en la mitigación de microalgas tóxicas, pero resultó ser un agente potencialmente nocivo para organismos que habitan en un ambiente tratado con este agente mitigador.

Nuestros resultados están en concordancia con la literatura (Matthijs et al., 2011; Burson et al., 2014) y se muestra que dosis bajas de 50 ppm de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, si bien no son letales inmediatamente al ser aplicadas, pueden ejercer un efecto muy nocivo en las microalgas tóxicas luego de 60 min de exposición. De esta manera, el peróxido resulta ser un agente efectivo para la inactivación de especies FANs que se detectan en los sistemas de fiordos del sur de Chile. Sin embargo, dosis tan bajas como 50 ppm de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son capaces de disminuir la viabilidad de las células branquiales (< 20 % en comparación con el control negativo). Más aún, en este estudio se observó que aplicaciones de peróxido en aguas marinas con alta abundancia de microalgas (sin importar si son nocivas o inocuas), incrementa el efecto citotóxico en el ambiente comparado con un escenario de baja abundancia de microalgas. Se sugiere que este efecto se debe a la presencia de ácidos grasos libres en las microalgas, los cuales son susceptibles a peroxidación a través de la interacción con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (lipoperoxidación), transformándose en aldehídos más citotóxicos para los organismos (Dorantes-Aranda et al., 2015; Mardones et al., 2015).

En las últimas décadas, se ha puesto particular interés en el uso de granos finos de sedimento, particularmente ciertas arcillas, para la floculación de microalgas nocivas y sus toxinas en ambientes marinos y continentales. Actualmente, el uso de arcillas ha sido uno de los pocos métodos de mitigación de FANs aplicados en el campo (Anderson et al., 2001; Kim, 2006; Yu et al., 1993; Getchis y Shumway, 2017). Sin embargo, las arcillas naturales tienen una baja eficiencia floculante, que es el inconveniente más grave que muchas veces lleva a requerir una cantidad exorbitante de arcillas para lograr una eficiencia efectiva en el campo. Como resultado, esto conduce a un mayor impacto ecológico, mayores costos y desafíos logísticos. Por ejemplo, la dosis de arcilla utilizada en algunos sitios de acuicultura en Japón fue de 110–400 t/km<sup>2</sup> (Shirota, 1989), y la dosis de loess utilizada en el control de las floraciones del dinoflagelado *Cochlodinium polykrikoides* en Corea fue de 384 t/km<sup>2</sup> (Anderson et al., 2001). Por lo tanto, la baja eficiencia de remoción, la alta dosificación y las grandes cargas de deposición en los sedimentos constituyen el cuello de

botella del método de la arcilla cuando se aplica en el campo (Sengco et al., 2001; Yu et al., 2004; Getchis y Shumway, 2017). A partir de estas observaciones, se han realizado numerosos estudios para mejorar la eficiencia de remoción de microalgas tóxicas con el uso de arcillas (Lee et al., 2008; Liu et al., 2010). Se ha propuesto la teoría de la modificación de la superficie de la arcilla y métodos para mejorar su eficiencia de remoción de microalgas tóxicas desde la columna de agua. Se han preparado varias arcillas modificadas con eficiencias de eliminación que son docenas a cientos de veces mayores que las arcillas naturales no modificadas, y el requerimiento de dosificación resultante se redujo a 4–10 t/km<sup>2</sup>. El mecanismo de acción para el control de FANs usando arcilla se basa en las interacciones de floculación entre las microalgas y las partículas de arcilla. La teoría de la modificación de la superficie de la arcilla se basa principalmente en la teoría clásica de la colisión (Smoluchowski, 1917), que ilustra bien el mecanismo de interacción entre las partículas de arcilla modificadas y microalgas generadoras de FANs: la modificación de la superficie de la arcilla aumenta la interacción electrostática, los puentes y el entrelazamiento, lo que mejora la colisión efectiva entre las microalgas y las partículas de arcilla, y por lo tanto la eficiencia de remoción se mejora significativamente (Liu et al., 2016; Yu et al., 1994; Shammas, 2005).

### **Arcillas**

3. En este estudio usamos dos tipos de arcillas modificadas obtenidas desde un proveedor en China para determinar su efectividad en la remoción de células vegetativas de 3 especies de microalgas productoras de FANs y sus respectivas toxinas. Se logró determinar que ambas arcillas no generan el mismo poder de remoción y tienen un importante efecto en el pH del medio (acidificación) en relación directa con la concentración de arcilla, lo cual tiene un potencial efecto en la integridad de la viabilidad celular de las microalgas como co-factor mitigante. Se observó que en general, todas las concentraciones de arcillas probadas tienen un efecto sobre la integridad de las microalgas, con un potencial efecto sub-letal a bajas dosis (0.1 g L<sup>-1</sup>) y un efecto letal a mayor concentración de arcilla (>0.5 g L<sup>-1</sup>). Estos resultados coinciden, por ejemplo, con pruebas realizadas por Rensel et

al. (2004) que encontraron una alta eficiencia de remoción de *Heterosigma akashiwo* en mesocosmos tratados con 0.12 g L<sup>-1</sup> de arcilla fosfatada en una zona costera de Washington, Estados Unidos. Sin embargo, la eficiencia de remoción de las arcillas modificadas ha sido ampliamente variada principalmente en los trabajos de campo (ver revisión bibliográfica de informe de avance 1), lo cual tiene relación con el tamaño, forma y composición de la especie tratada y la condición físico-química de la columna de agua local (Anderson et al., 2001). Esta observación coincide con nuestros resultados, lo cual se evidenció con la diferente sensibilidad de las 3 microalgas expuestas a las arcillas y por el efecto diferenciado que producen diferentes condiciones de temperatura y salinidad en la eficiencia de remoción de células desde el medio acuoso. Este resultado es de extrema importancia para la potencial aplicación de arcillas modificadas en el sistema de fiordos de sur de Chile debido a su compleja variabilidad, lo que instaría a establecer criterios de aplicación de este producto según las condiciones locales de cada zona costera.

#### **IMTA (cultivo integrado multitrófico)**

4. En este estudio, los resultados de la evaluación del efecto de los exudados de macroalgas como sustancias líticas de microalgas formadoras de FANs mostraron, a través de distintos experimentos de co-cultivo (flujo abierto y mesocosmo), que podrían existir efectos alelopáticos de las macroalgas sobre las especies FANs y comunidad fitoplactónica, que produzcan efectos negativos o de mortalidad. Aunque, hay que considerar que los efectos negativos fueron especie específico. Interesantemente, se observó que el co-cultivo de una especie altamente citotóxica como *K. selliformis* con macroalgas produjo la disminución de la citotoxicidad.

#### **UV**

5. En este estudio, se realizaron experimentos de exposición de la comunidad fitoplanctónica a distintas dosis de UV. Estos experimentos se llevaron a cabo en condiciones de uso real, lo que fue posible gracias a que la empresa Patagonia

Wellboat nos permitió realizar experimentos en uno de sus barcos donde tienen instalado un sistema de mitigación UV de la empresa Atlantium. Este sistema de mitigación se usa para controlar el virus ISA al que se le aplican dosis de 90 mJ cm<sup>2</sup> según la normativa. La evaluación del efecto de dosis de UV sobre la comunidad fitoplanctónica se realizó aplicando dosis que progresivamente fueron incrementando desde 103 mJ cm<sup>2</sup> hasta 450 mJ cm<sup>2</sup>. Los resultados revelaron que el UV tiene una baja eficacia para actuar como agente mitigante. No obstante, futuros experimentos deberían evaluar los posibles efectos subagudos en la comunidad fitoplanctónica a través del tiempo, es decir, si es que las células son capaces de reproducirse e incrementar su biomasa después de haber sido expuestas a altas dosis de UV.

**Objetivo Específico 3.** Evaluar la peligrosidad de los productos y sub-productos que se generan de la aplicación de los métodos de mitigación o inactivación celular en diferentes condiciones y escalas de tiempo.

- En este proyecto se incluyó la evaluación de la citotoxicidad, mediante líneas celulares branquiales, de los biocidas y técnicas de mitigación utilizadas (arcillas, peróxido de hidrogeno, dióxido de cloro y cultivo multitrófico integrado) y de los posibles subproductos generados luego de la aplicación. Así, se observó que el peróxido de hidrogeno es toxico en todas las concentraciones utilizadas y que especies no nocivas expuestas a este agente se pueden generar efectos tóxicos en el ambiente. Respecto al dióxido de cloro las menores concentraciones no afectaron la viabilidad de las líneas, pero tampoco tuvieron un efecto en las especies formadoras de FANs. En tanto que los efectos de las arcillas dependieron del tipo utilizado. Por último, las posibles sustancias alelopáticas originadas del co-cultivo macroalga-microalga parecen no afectar la viabilidad de líneas celulares. El

uso de líneas celulares es una poderosa herramienta para la evaluación de la peligrosidad de los productos y subproductos utilizados en las medidas de mitigación.

- La revisión de la literatura mostró que existen muy pocos estudios científicos que avalen el uso de estas metodologías para la mitigación de FANs. Los métodos químicos son los más estudiados y regulados, pero su uso ha sido principalmente para inactivar virus y bacterias, y en baja medida para inactivar cianobacterias en sistemas continentales para uso de agua potable. Las arcillas modificadas solo han sido descritas de forma más específica en China, pero los efectos deletéreos en el medioambiente han sido poco abordados. El caso más interesante son las cortinas de burbujas utilizadas en la salmonicultura local. A pesar de que son el sistema de mitigación de FANs más usado en Chile, no existe oficialmente una norma que las regule, y no existen estudios científicos que demuestren su efectividad frente a floraciones de microalgas ictiotóxicas.

**Objetivo específico 4.** Identificar brechas normativas y hacer recomendaciones de las condiciones para la utilización y fiscalización de los sistemas de eliminación en sistemas cerrados y del correcto uso de los sistemas de control en el medio natural, incluyendo una evaluación de volúmenes y costos.

-En la mayoría de los experimentos se observó que las mitigaciones por medio de agentes químicos-físicos de especies FANs son especies-dependiente. Así, algunas agentes mitigantes como las arcillas y peróxido de hidrogeno pueden generar mortalidad de las especies FANs exponiéndolas a diferentes concentraciones. Adicionalmente, la aplicación de estos biocidas puede potenciar los efectos citotóxicos o disminuirlos. Por otro lado, se hace necesario incorporar evaluaciones a nivel de uso real ya que los experimentos realizados en laboratorio muchas veces no incluyen importantes variables que se presentan en terreno.

-Se recomienda avanzar en la generación de normativa para el uso de sistemas de mitigación en Chile donde queden identificadas los ámbitos de competencia de cada una de las instituciones asociadas en la evaluación, experimentación y aprobación. Las evaluaciones además deben ser realizadas in situ considerando los posibles efectos en

especies no objetivo de mitigación.

## Referencias

Anderson, D.M., Andersen, P., Bricelj, V.M., Cullen, J.J., Rensel, J.E., 2001. Monitoring and management strategies for harmful algal blooms in coastal waters, APEC #201-MR-01.1, Asia Pacific Economic Program, Singapore, and Intergovernmental Oceanographic Commission Technical Series No. 59, Paris. 264p.

Barrington, D.J., Reichwaldt, E.S., Ghadouani, A., 2013. The use of hydrogen peroxide to remove cyanobacteria and microcystins from waste stabilization ponds and hypereutrophic systems. *Ecol. Eng.* 50, 86-94.

Barroin, G., Feuillade, M., 1986. Hydrogen peroxide as a potential algicide for *Oscillatoria rubescens* D.C. *Water Res.* 20, 619-623.

Bols, N.C., Barlian, A., Chirino-Trejo, M., Caldwell, S.J., Goegan, P., Lee, L.E.J., 1994. Development of a cell line from primary cultures of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), gills. *J. Fish. Dis.* 17, 601– 611.

Burson, A., Matthijs, H. C., de Bruijne, W., Talens, R., Hoogenboom, R., Gerssen, A & Huisman, J. (2014). Termination of a toxic *Alexandrium* bloom with hydrogen peroxide. *Harmful Algae*, 31, 125-135.

Carmichael, W., 2008. A world overview – One-hundred twenty-seven years of research on toxic cyanobacteria – Where do we go from here? In: Hudnell, H.K. (Ed.). *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Springer, New York. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 619, 105-125.

Chopin, T., A.H. Buschmann, C. Halling, M. Troell, N. Kautsky, A. Neori, G.P. Kraemer, J.A. Zertuche- Gonzalez, C. Yarish, and C. Neefus. 2001. Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: a key toward sustainability. *J. Phycol.* 37, 975–986.

Chorus, I. and J. Bartram (eds.) 1999. Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. London: E&FN Spon, 1999.

Dorantes-Aranda, J.J., Seger, A., Mardones, J.I., Nichols, P.D., Hallegraeff, G.M., 2015. Progress in understanding algal bloom-mediated fish kills: the role of superoxide radicals, phycotoxins and fatty acids. *PLoS One* 10 (7), e0133549.

Dayeh, V.R., Schirmer, K., Lee, L.E.J., Bols, N.C., 2005. Rainbow trout gill cell line microplate cytotoxicity test. In: Blaise, C., Férard, J.F. (Eds.), *Small-Scale Fresh-water Toxicity Investigations*. Springer, the Netherlands, pp. 473–503.

Gregg, M., G. Rigby, and G.M. Hallegraeff. 2009. Review of two decades of progress in the development of management options for reducing or eradicating phytoplankton, zooplankton and bacteria in ship's ballast water. *Aquatic Invasions* 4, 521–565.

Getchis, T.L., Shumway, S.E., 2017. Harmful algae: an executive summary. Connecticut Sea Grant College Program. CTSG-17-08 (16 pp.).

Guardiola, F.A., A. Cuesta, J. Meseguer, and M.A. Esteban. 2012. Risks of using antifouling biocides in aquaculture. *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 1541–1560.

Guillard, R.R.L., Ryther, J.H., 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* 8, 229–239.

Horner, R.A., Garrison, D.L., Plumley, F.G., 1997. Harmful algal blooms and red tide problems on the U.S. west coast. *Limnology and Oceanography*, 42: 1076-1088.

Kim, H.G., 2006. Mitigation and controls of HABs. In: Granéli, E., Turner, J.T. (Eds.), Ecology of Harmful Algae. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 327–338.

Lee, Y.J., Choi, J.K., Kim, E.K., Youn, S.H., Yang, E.J., 2008. Field experiments on mitigation of harmful algal blooms using a Sophorolipid—Yellow clay mixture and effects on marine plankton. Harmful Algae 7 (2), 154–162.

Liu, G.F., Fan, C.X., Zhong, J.C., Zhang, L., Ding, S.M., Yan, S.H., Han, S.Q., 2010. Using hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) modified clays to clean the *Microcystis aeruginosa* blooms in Lake Taihu, China. Harmful Algae 9 (4), 413–418.

Liu, Y., Cao, X.H., Yu, Z.M., Song, X.X., Qiu, L.X., 2016. Controlling harmful algae blooms using aluminum- modified clay. Mar. Pollut. Bull. 103 (1–2), 211–219.

Mattheiss, J., Sellner, K.G., Ferrier, D., 2017. Lake Anita Louise peroxide treatment summary – December 2016. CCWS Contribution #17-01. Center for coastal and watershed studies (CCWS), Hood College, Frederick, MD:9 p.

Matthijs, H.C.P., Visser, P.M., Reeze, B., Meeuse, J., Slot, P.C., Wijn, G., Talens, R., Huisman, J., 2011. Selective suppression of harmful cyanobacteria in an entire lake with hydrogen peroxide. Water Res. 46, 1460 – 1472.

Mardones, J.I., Dorantes-Aranda, J.J., Nichols, P.D., Hallegraeff, G.M., 2015. Fish gill damage by the dinoflagellate *Alexandrium catenella* from Chilean fjords: Synergistic action of ROS and PUFA. Harmful Algae 49, 40-49.

Mardones, J.I., Dorantes-Aranda, J.J., Seger, A., Nichols, P., Hallegraeff, G.M., 2016. Avances en el estudio de ictiotoxinas asociadas con floraciones algales nocivas (FANs). Salmonexpert 38(6), 38-44.

Mardones, J.I., 2020. Screening of Chilean fish-killing microalgae using a gill cell-based assay. *Latin Am. J. Aquat. Res.* 48(2), 329-335.

Mardones, J.I., Norambuena, L., Paredes, J., Fuenzalida, G., Dorantes-Aranda, J.J., Lee, K.J., Guzmán, L., Krock, B., Hallegraeff, G., 2020b. Unraveling the *Karenia selliformis* complex with the description of a non- gymnodimine producing Patagonian phylotype. *Harmful Algae* 98, 101892.

Mardones, J.I., Paredes, J., Godoy, M., Suarez, R., Norambuena, L., Vargas, V., Fuenzalida, G., Pinilla, E., Artal, O., Rojas, X., Dorantes-Aranda, J.J., Lee, K.J., Anderson, D.M., Hallegraeff, G.M. 2020. Disentangling the environmental processes responsible for the world's largest farmed fish-killing harmful algal bloom: Chile, 2016. *Sci. Total Env.* 766, 144383.

Maxwell, K., and Johnson, G. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51 (345), 659 -668.

Nanayakkara, N.P.D., Schrader, K.K., 2011. Evaluation of free radical-generating compounds for toxicity towards the cyanobacterium *Planktothrix perornata*, which causes musty off-flavour in pond-raised channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture Res.* 42, 1895 – 1898.

Nash, C.E., 2001. The net-pen salmon farming industry in the Pacific Northwest. U.S. Department of Commerce, NOAA technical memo, NMFS-49, NOAA, Washington, DC: 125p.

NOWPAP CEARAC. 2007. Booklet on countermeasures against harmful algal blooms (HABs) in the NOWPAP region. NOWPAP, Toyama City, Japan, 58 p.

Oxborough, K., Moore, C.M., Suggett, D.J., Lawson, T., Chan, H.G., and Geider, R.J. 2012.

Direct estimation of functional PSII reaction center concentration and PSII electron flux on a volume basis: a new approach to the analysis of Fast Repetition Rate Fluorometry (FRRF) data. *Limnol. Oceanogr. Methods* 10, 2012, 142–154.

Onji, M., Sawabe, T., & Ezura, Y. (2000). An evaluation of viable staining dyes suitable for marine phytoplankton. *北海道大學水産學部研究彙報*, 51(3), 153-157.

Pagé, B., Pagé, M., Noël, C., 1993. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in vitro. *Int. J. Oncol.* 3, 473–476.

Park, S.-C., J.-K. Lee, S.W. Kim, and Y. Park. 2011. Selective algicidal action of peptides against harmful algal bloom species. *PLoS ONE* 6(10), 1–10.

Rensel, J.E., Whyte, J.N.C., 2003. Finfish mariculture and harmful algal blooms. In: UNESCO Manual on Harmful Marine Microalgae, 2nd ed. Anderson, D., Hallegraeff, G., Cembella, A. (Eds.). IOC Monographs on Oceanography Methodology. IOC: p. 693-722.

Rodríguez, E., Onstad, G.D., Kull, T, P,J., Metcalf, J.S., Acero, J.L., Gunten, U., 2007. Oxidative elimination of cyanotoxins: Comparison of ozone, chlorine, chlorine dioxide and permanganate. *Water Res.* 41, 3381- 3393.

Seger, A., Park, T-G., Hallegraeff, G., 2017. Assessment of the efficacy of clay flocculation in Korean fish farm waters: *Cochlodinium* cell removal and mitigation of ichthyotoxicity. *Harmful Algae* 61, 46-55.

Seguel, M., Varela, D., Paredes, J., Aguilera, A., Alarcón, R., Martínez, C., Díaz, M., Zuñiga, A., 2018a. Effect of different algicidal on the viability of *Alexandrium catenella* at laboratory conditions. International Conference on Harmful Algae ICHA 2018, Nantes, Francia.

Seguel, M., Varela, D., Paredes, J., Aguilera, A., Kossmann, H., Vogel, J., Martinez, C., 2018b. Algicidal effects of Bioionix's electro-chemical technology on *Alexandrium catenella*: laboratory and field experiments. International Conference on Harmful Algae ICHA 2018, Nantes, Francia.

Seltenrich, N. 2014. "Keeping Tabs on HABs: New Tools for Detecting, Monitoring, and Preventing Harmful Algal Blooms." Environmental Health Perspective 122: A206-A213. DOI: 10.1289/ehp.122-A206.

Sengco, M.R., Li, A.S., Tugend, K., Kulis, D., Anderson, D.M., 2001. Removal of red- and brown-tide cells using clay flocculation. I. Laboratory culture experiments with *Gymnodinium breve* and *Aureococcus anophagefferens*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 210, 41–53.

Shammas, N.K., 2005. Coagulation and flocculation. In: Wang, L.K., Hung, Y.T., Shammas, N.K. (Eds.),

Physicochemical Treatment Processes, vol. 3. Humana Press, New Jersey, pp. 103–139 (2004). Shirota, A., 1989. Red tide problem and countermeasures (II). Int. J. Aquat. Fish Technol. 1, 195–223.

Smoluchowski, M.V., 1917. Versuch einer mathematischen theorie der koagulationskinetik kolloider Lösungen. Zeitschrift für physikalische Chemie 92 (1), 129–168.

Trainer, V., Moore, S.K., Hallegraeff, G., Kudela, R.M., Clément, A., Mardones, J.I., Cochlan, W.P., 2019. Pelagic harmful algal blooms and climate change: Lessons from nature's experiments with extremes. Harmful Algae 91, 101591.

Turner, J.T. 2006. Harmful algae interactions with marine planktonic grazers. In: Ecology of Harmful Algae.

Granéli and J.T. Turner (Eds.). Ecol. Stud. 189. Springer, New York: p. 259–270.

Uddin, M.R., S.K. Min, J.D. Kim, S.U. Park, and J.Y. Pyon. 2012. Sorgoleone, a sorghum root exudate: algicidal activity and acute toxicity to the ricefish *Oryzias latipes*. *Aquat. Bot.* 98, 40–44.

Whyte, J.N.C., 1997. Impacts of harmful algae on the west-coast aquaculture industry and a national research plan by the Phycotoxins Working Group of Fisheries and Oceans. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada*, 97-103.

Whyte, J.N.C., Haigh, N., Ginther, N.G., Keddy, L.J., 2001. First record of blooms of *Cochlodinium* sp. (Gymnodiniales, Dinophyceae) causing mortality to aquacultured salmon on the west coast of Canada. *Phycologia*, 40, 298-304.

Wu, X., E.M. Joyce, and T.J. Mason. 2011. The effects of ultrasound on cyanobacteria. *Harmful Algae* 10, 738–743.

Yang, Z., W. Jiang, Y. Zhang, and T.M. Lim. 2015. Inactivation of dinoflagellate *Scrpsiella trochoidea* in synthetic ballast water by advanced oxidation processes. *Environ. Tech.*, 36, 750–759.

Yu, Z.M., Zou, J.Z., Ma, X.N., Li, Q.S., 1993. The chemical means of controlling red tides. *Oceanol. Limnol. Sin.* 24 (3), 314–318 (in Chinese).

Yu, Z.M., Zou, J.Z., Ma, X.N., 1994. A new method to improve the capability of clays for removing red tide organisms. *Oceanol. Limnol. Sin.* 25 (2), 226–232 (in Chinese).

Yu, Z.M., Sengco, M.R., Anderson, D.M., 2004. Flocculation and removal of the brown tide organism,

*Aureococcus anophagefferens* (Chrysophyceae), using clays. *J. Appl. Phycol.* 16 (2), 101–110.

Zamyadi, A., Ho, L., Newcombe, G., Bustamante, H., Prévost, M., 2012. Fate of toxic cyanobacterial cells and disinfection by-products formation after chlorination. *Water Res.* 46, 1524 – 1535.

Zerrifi, S.E.A., Khalloufi, F.E., Oudra, B., Vasconcelos, V., 2018. Seaweed bioactive compounds against pathogens and microalgae: Potential uses on pharmacology and harmful algae bloom control. *Mar. Drugs* 16, 55, doi: 10.3390/md16020055.

Zhou, L.H., T.L. Zheng, X.H. Chen, X. Wang, S.B. Chen, Y. Tian, and H.S. Hong. 2008. The inhibitory effects of garlic (*Allium sativum*) and diallyl trisulfide on *Alexandrium tamarense* and other harmful algal species. *J. Appl. Phycol.* 20, 349–358.

# ANEXOS

## ANEXO 1

Carta Gantt de actividades y resultados esperados

Actividad	Resultado esperado asociado	Meses																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1. Actividades Generales																						
a) Implementación de laboratorio y coordinación de actividades	Compra de reactivos, fungibles y coordinación de actividades.																					
5.1 Objetivo específico. Describir y comparar los sistemas de mitigación o inactivación de células de microalgas tóxicas a nivel mundial para evitar su dispersión y efectos nocivos v/o tóxicos en ambientes naturales con el	Generación de informe que contenga la comparación y descripción de sistemas de mitigación o inactivación. Este informe tendrá toda la información generada en las actividades 1 a 5.																					
Actividad 1 5.1.1. Recopilación de información:	Generación de un archivo bibliográfico con las investigaciones más relevantes.																					
Actividad 2 5.1.2. Confección de fichas:	Sistematización de información y generación de fichas.																					
Actividad 3 5.1.3. Comparación de sistemas de mitigación:	Sistematización de información y generación de tablas comparativas.																					
Actividad 4 5.1.4. Selección de sistemas:	Establecimiento de sistemas de mitigación o inactivación que mejor se pueden adaptarse.																					
Actividad 5 5.1.5. Sistematización de normativa:	Generación de tablas comparativas entre países seleccionados.																					
5.2.1 Objetivo específico 2 Realizar experimentos multifactoriales in vitro con al menos tres sistemas de control diferentes, utilizando al menos tres micro algas tóxicas chilenas, para cuantificar el efecto sobre las microalgas y sobre la concentración de toxinas en el agua.	Generación de un informe con los resultados experimentales. Este informe incluirá, introducción, metodología, resultados, conclusiones, bibliografía. Incluirá la información de las actividades 6 a 12.																					
Actividad 6 5.2.1. Cultivo y mantención de microalgas tóxicas:	Mantención de microalgas tóxicas.																					
Actividad 7 5.2.2. Cultivo y mantención de líneas celulares branquiales RTgill-W1	Mantención de líneas celulares branquiales RTgill-W1																					
Actividad 8 5.2.3. Experimentos con métodos de mitigación para sistemas cerrados:	Evaluación del efecto de biosidas: UV, peróxido hidrogeno, dióxido de cloro; en la viabilidad celular de especies nocivas y líneas celulares branquiales RTgill-W1																					



## Equipo de Trabajo

<b>Nombre</b>	<b>Profesión</b>	<b>Institución</b>	<b>Función</b>
Jorge Mardones	Biólogo Marino. PhD. Ecología marina	IFOP	Director
Javier Paredes	Biólogo Marino. Ecología y biología aplicada	IFOP	Subdirector
Ana Flores	Bióloga Marina.	IFOP	Investigadora
Marco Pinto	Biólogo Marino. Dr. Ciencias de la acuicultura	IFOP	Investigador
Pablo Leal	Biólogo Marino. PhD. Ciencias marinas	IFOP	Investigador
Pablo Salgado	Biólogo Marino. Dr. Ciencias marinas	IFOP	Investigador
Luis Norambuena	Bioquímico	IFOP	Investigador

## Tiempo comprometido en otros estudios

Nombre	Estudio en que participa (Fipa u otros estudios)	Situación Estudio (adjudicado o en ejecución)	Tiempo comprometido en meses restantes
Jorge Mardones	ASIPA: Programa de manejo y monitoreo de las mareas rojas en el sistema de fiordos y canales de Chile (XIV etapa) 2020-2021	ejecución	5 meses
	ASIPA: Programa de Manejo y Monitoreo de las Floraciones Algales Nocivas y Toxinas Marinas en el Océano Pacífico del Centro Sur de Chile (36° - 44 °S), Etapa II, 2020 – 2021.	ejecución	5 meses
Javier Paredes	ASIPA: Programa de manejo y monitoreo de las mareas rojas en el sistema de fiordos y canales de Chile (XIV etapa) 2020-2021	ejecución	5 meses
	ASIPA: Programa de Manejo y Monitoreo de las Floraciones Algales Nocivas y Toxinas Marinas en el Océano Pacífico del Centro Sur de Chile (36° - 44 °S), Etapa II, 2020 – 2021.	ejecución	5 meses
Pablo Leal	ASIPA: Programa integral de desarrollo de acuicultura de algas para pescadores artesanales, IV etapa, año 2020-2021	ejecución	5 meses
	FONDECYT iniciación 11190297: Metabolic interactions between bivalves and macroalgae in co-culture under warmer and acidified conditions 2019-2021	ejecución	17 meses
Pablo Salgado	ASIPA: Programa de manejo y monitoreo de las mareas rojas en el sistema de fiordos y canales de Chile (XIV etapa) 2020-2021	ejecución	5 meses
	ASIPA: Programa de Manejo y Monitoreo de las Floraciones Algales Nocivas y Toxinas Marinas en el Océano Pacífico del Centro Sur de Chile (36° - 44 °S), Etapa II, 2020 – 2021.	ejecución	5 meses

Luis Norambuena	ASIPA: Programa de manejo y monitoreo de las mareas rojas en el sistema de fiordos y canales de Chile (XIV etapa) 2020-2021	ejecución	5 meses
	ASIPA: Programa de Manejo y Monitoreo de las Floraciones Algales Nocivas y Toxinas Marinas en el Océano Pacífico del Centro Sur de Chile (36° - 44 °S), Etapa II, 2020 – 2021.	ejecución	5 meses

## ANEXO 4

Divulgación de resultados preliminares (Congreso de Ciencias del Mar 2021)



Con el trabajo:

**Estrategias para mitigar floraciones algales nocivas (FANs) en Chile: actual conocimiento y futuras perspectivas**

**Ana Flores Leñero<sup>1</sup>, Maximiliano Vergara-Jara<sup>1</sup>, Javier Paredes-Mella<sup>1</sup>, Jorge I. Mardones<sup>1, 2</sup>.**

(1) Centro de Estudios de Algas Nocivas (CREAN), Instituto de Fomento Pesquero (IFOP), Puerto Montt, Chile..

(2) Centro de Investigación en Dinámica de Ecosistemas Marinos de Altas Latitudes (IDEAL), Valdivia, Chile..

**A N E X O 5**

**Taller de presentación de resultados FIPA 2020-08**

El taller de finalización y presentación de resultados del proyecto FIPA 2020-08 se realizó el viernes 25 de noviembre de 2022 entre las 9:00 am y las 12:30pm. El taller se estructuró en seis charlas temáticas y una charla introductoria a las normativas por parte de la SUBPESCA. El taller contó con 79 asistentes de distintas instituciones gubernamentales, académicas, nacionales e internacionales. Las principales preguntas se enfocaron al uso potencial de las arcillas modificadas en nuestro país y a los resultados obtenidos en relación con las cortinas de burbujas.

En anexo 5, se adjuntan las presentaciones realizadas en el taller, el programa realizado y la lista de asistentes.



## INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

Almte. Manuel Blanco Encalada 839 Fono 56-32-2151500  
Valparaíso, Chile [www.ifop.cl](http://www.ifop.cl)