

# Estudios sobre el potencial impacto de ondas ultrasónicas en *Skeletonema pseudocostatum*, productor primario del ecosistema marino.

Analia Tolivia<sup>1,2</sup>, Ángela Juárez<sup>3</sup>, Igor Prario<sup>1,2</sup>, Patricio Bos<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Propagación Acústica. Dirección de Investigación de la Armada (DIIV). Laprida 555 Vicente López, (1638) Buenos Aires, Argentina. [analiatolivia@gmail.com](mailto:analiatolivia@gmail.com)

<sup>2</sup> UNIDEF (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas – Ministerio de Defensa)

<sup>3</sup> Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Buenos Aires, Argentina.

**Resumen.** La utilización de ultrasonido como metodología alternativa para el sensado remoto de las floraciones algales es una técnica incipiente para la evaluación ambiental de ecosistemas marinos. Sin embargo, el ultrasonido de potencia puede inducir cambios químicos y físicos, tales como el aumento de la temperatura localizada y la formación de radicales libres, lo que puede dañar enzimas y afectar procesos metabólicos importantes. Por lo tanto, es crucial comprender sus efectos sobre los organismos, sobre todo bajo un contexto de exploración offshore y/o monitoreos que involucren la emisión de ondas sonoras para mapear grandes extensiones marinas. Para abordar esta temática, se sonorizaron cultivos unialgales de *Skeletonema pseudocostatum* a dosis crecientes de ultrasonido (~5MHz), y se evaluaron sus efectos mediante análisis de parámetros metabólicos y marcadores de estrés oxidativo. Los resultados preliminares muestran que la perturbación sonora altera el metabolismo de las microalgas y alerta sobre potenciales impactos en la productividad del ecosistema.

**Palabras clave:** Ultrasonido, Fitoplancton, Marcadores bioquímicos, Estrés Oxidativo, Impacto Ambiental.

## 1 Introducción

Las microalgas fitoplanctónicas constituyen una comunidad clave de los océanos por encontrarse en la base de las redes tróficas sustentando los niveles superiores. Su caracterización incluye determinación de biomasa e identificación de especies presentes y es un tema de especial interés, en particular, bajo un contexto de exploración offshore y/o monitoreos que involucren la emisión de ondas sonoras para mapear grandes extensiones marinas. Esta caracterización tradicionalmente requiere del muestreo de agua de mar, de la identificación de las especies o grupos taxonómicos presentes y de llevar a cabo el recuento óptico de los organismos. Estas metodologías son generalmente precisas pero demandan mucho tiempo. Desde la hidroacústica, se busca contribuir a la detección y caracterización del fitoplancton en el mar usando una metodología alternativa sobre la base de la teoría de la dispersión acústica de volumen (*scattering*).

La propagación de una onda sonora en el mar, encuentra a su paso diversas inhomogeneidades, correspondientes a discontinuidades en las propiedades físicas del medio, que provocan reirradiación de parte de la energía transportada por la onda acústica, generando el fenómeno físico de dispersión por elementos de volumen. Si la dispersión ocurre en la misma dirección que la onda incidente y en sentido contrario, se denomina retrodispersión (o *backscattering*). El fenómeno físico de dispersión constituye de esta forma, una herramienta útil para el potencial sensado remoto de las propiedades físicas de los elementos de volumen que lo generan, dado que el efecto producido por cada dispersor depende de sus propiedades físicas, de sus dimensiones y forma así como de las propiedades del fluido y de la frecuencia de la señal incidente. Dependiendo del tamaño de los organismos fitoplanctónicos es necesario utilizar frecuencias en el rango ultrasónico entre 1 MHz y 30 MHz según la especie que se quiera monitorear [1, 2]. Para la detección de ciertas especies de diatomeas, tales como *Skeletonema costatum* y *Skeletonema marinoi*, se utilizan transductores ultrasónicos con frecuencias entre 2 MHz y 5 MHz, siendo necesaria la proyección de suficiente potencia acústica en el medio acuoso como para generar una señal dispersada que pueda ser detectada por un hidrófono o transductor sensible a la misma frecuencia [3].

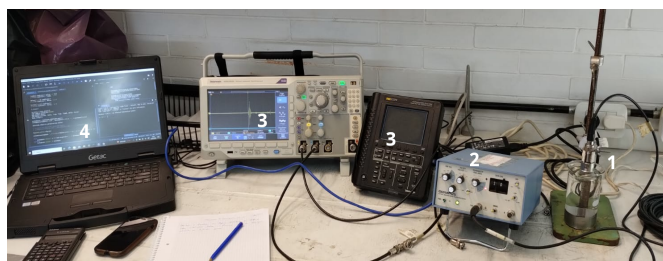
En cuanto a los efectos que produce la sonorización de microalgas con ultrasonido, distintos trabajos abordan la temática desde el punto de vista de la disrupción celular considerando el contenido lipídico de ciertas especies y su potencial cultivo para la obtención de biodiesel [4, 5], o con el objetivo de su inactivación para el control de floraciones en aguas continentales [6]. Sin embargo en todos los casos, las frecuencias de sonorización se encuentran por debajo del rango requerido para producir retrodispersión acústica.

En condiciones adecuadas, la aplicación de ultrasonido de potencia (20-40 kHz), inducen cambios químicos y físicos en un medio líquido mediante la generación y posterior destrucción de burbujas de cavitación. Entre los efectos atribuidos al colapso de las cavidades se encuentran el aumento de la temperatura localizada, la sonoluminiscencia, la quimioluminiscencia y formación de radicales libres [7]. Sin embargo, nada se sabe sobre los efectos que podrían tener sobre las microalgas la metodología acústica propuesta para la estimación de biomasa y caracterización del fitoplancton. Es por esto que resulta de particular interés conocer si esta metodología alternativa para el sensado remoto altera a las células fitoplanctónicas.

## 2 Metodología

Se cultivó *Skeletonema pseudocostatum* en un medio compuesto por agua de mar filtrada y pasteurizada, con adición de Alga-Gro® Concentrated Medium. Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones controladas de iluminación (fotoperíodo 12:12) y temperatura (22 ± 1°C). Al final de la fase exponencial de crecimiento, se realizaron los bioensayos por cuadruplicado exponiendo diferentes cultivos a cuatro dosis crecientes de ultrasonido utilizando el *set-up* experimental que se muestra en la

Figura 1. Cuatro cultivos se mantuvieron sin sonarizar (controles). Los recuentos celulares se realizaron en cámara de Neubauer.



**Fig. 1:** Set-up experimental para sonarización de cultivos microalgales. Se observan el transductor ultrasónico (1) inmerso en el medio de cultivo en un vaso de precipitados, el pulse-receiver (2) conectado al transductor, los osciloscopios digitales (3) para adquisición y visualización de la señal y la PC (4) para adquisición de datos.

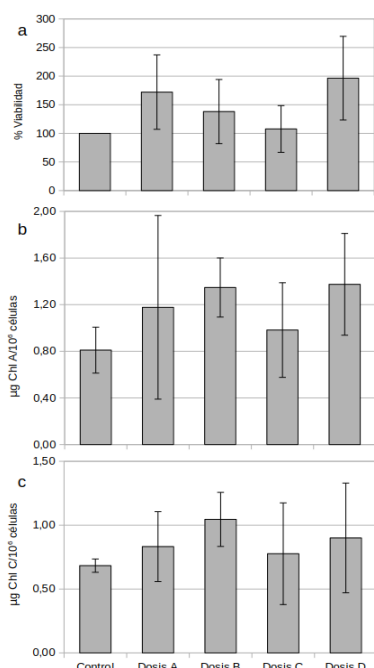
Para sonarizar las muestras se colocaron 250 ml de cultivo en una vaso de precipitados y se sonarizaron con un transductor de inmersión. Los procedimientos hasta el momento de la sonarización se realizaron en cámara de flujo laminar a fin de minimizar la contaminación. Los pulsos acústicos se generaron con un pulse/receiver Olympus 5077PR y la señal fue adquirida con un osciloscopio digital Tektronix TEKscope 60 Mhz y una PC con una rutina de adquisición automática (Figura 1). Posteriormente, los cultivos se fraccionaron y cosecharon para realizar el análisis de parámetros relacionados con el metabolismo y estrés oxidativo. El efecto de las diferentes dosis se evaluaron por cuadruplicado sobre la viabilidad celular, medida como actividad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa por el método de MTT [8], el contenido de clorofila a y c que se determinaron espectrofotométricamente siguiendo el protocolo de Lichtenthaler [9] y los siguientes marcadores de estrés oxidativo:

1. Niveles de especies reactivas de oxígeno (EROS): Las muestras se incubaron una hora en oscuridad con la sonda fluorescente  $H_2DCF-DA$  y se procedió a la lectura a 485 nm de emisión y 520 nm de excitación con un lector de fluorescencia [10].
2. Daño oxidativo a lípidos: Se evaluó mediante el método de TBARs [11].
3. Metabolitos antioxidantes no enzimáticos: Se cuantificaron los niveles de GSH/GSSG mediante la determinación del contenido de glutatión reducido y total usando ácido ditiobis nitrobenzoico (DTNB) a 412 nm [12], y el contenido de carotenos espectrofotométricamente [9]. Además se cuantificó el contenido de compuestos fenólicos como equivalentes de ácido gálico mediante el método de Folin-Ciocalteu [13].
4. Enzimas antioxidantes: Las mediciones se realizaron en sobrenadantes de homogenatos obtenidos tras ruptura celular y centrifugación. Se determinaron la actividad Ascorbato Peroxidasa mediante la formación de ácido dehidroascórbico a partir de ácido ascórbico, a 290 nm [14] y la actividad Glutathion S-transferasa midiendo la conjugación de glutatión con 1-cloro-2,4-dinitrobenzenceno a 340 nm [15].

Las diferencias entre tratamientos y controles se analizaron mediante ANOVA [16].

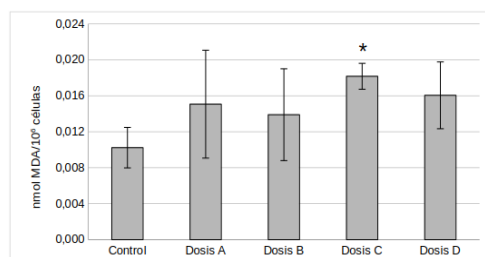
### 3 Resultados

Los resultados obtenidos muestran que la sonarización provocaría un aumento de la actividad mitocondrial y de los niveles celulares de clorofila a y c en las dosis más altas (Figura 2).



**Fig. 2:** a. Porcentaje de Viabilidad estimada como actividad de la enzima mitocondrial Succinato deshidrogenasa b. Contenido de clorofila A expresado como  $\mu g$  cada millón de células, c. Contenido de clorofila C expresado como  $\mu g$  cada millón de células.

La exposición a dosis crecientes de sonido también causó alteraciones en algunos marcadores de estrés oxidativo. Si bien las células tratadas con ultrasonido no mostraron diferencias, con respecto al control, en los niveles de Especies Reactivas de Oxígeno, Glutathion reducido (GSH) y Fenoles, sí mostraron un aumento significativo del daño a lípidos (Figura 3) y una disminución significativa de la actividad de las enzimas Ascorbato Peroxidasa y Glutathion S-transferasa cuando estuvieron expuestas a las dosis más altas. Esto último podría deberse a modificaciones provocadas en sus sitios activos y/o estructura por productos de la peroxidación lipídica. Si bien nuestros resultados son preliminares, muestran que la perturbación sonora altera el metabolismo de *Skeletonema pseudocostatum*, una diatomeas céntricas costera común en nuestras latitudes, hecho que alertaría sobre posibles impactos en la productividad del ecosistema dado que las diatomeas son responsables del 40% al 45% de la producción primaria global de compuestos orgánicos en el océano [17].



**Fig. 3:** Daño oxidativo a lípidos expresado como contenido de MDA (nmoles) cada millón de células.

## 4 Conclusiones

Se realizó un primer estudio para evaluar los efectos de la sonorización en microalgas. Las perturbaciones sonoras son capaces de alterar el metabolismo de las microalgas y ponen en alerta sobre los potenciales impactos en la productividad del ecosistema. En este trabajo se muestra que existen algunos cambios en la actividad mitocondrial y de los niveles celulares de clorofila a y c. Estos resultados preliminares alientan la realización de más estudios para comprender los mecanismos del impacto sonoro, sus consecuencias a largo plazo y los rangos que pueden tolerar organismos fitoplanctónicos tales como *Skeletonema pseudocostatum*.

## 5 Referencias

- Blanc, S., & de Milou, M. E. Dispersión acústica (*scattering*) producida por esferoides prolados. I PARTE: Fundamentación Teórica. INF. TEC. AS 3/09, DAS, SIID. (2009)
- Bok, T.-H., Paeng, D.-G., Kim, E., Na, J., & Kang, D. Ultrasound backscattered power from *Cochlodinium polykrikoides*, the main red tide species in the Southern Sea of Korea. *Journal of Plankton Research*, 32(4), 503–514.(2010)
- Cinquini, M., Bos, P., Prario, I., Blanc, S., & Tolivia, A. Metodología acústica alternativa para determinar abundancia numérica de dispersores de volumen presentes en el mar a frecuencias ultrasónicas. PARTE I: Estudio de factibilidad. INF. TEC. AS 5/15, DAS, DIIV (2013)
- Yamamoto, K., King, P. M., Wu, X., Mason, T. J., & Joyce, E. M. Effect of ultrasonic frequency and power on the disruption of algal cells. *Ultrasonics sonochemistry*, 24, 165-171 (2015)
- Wang, M., Yuan, W., Jiang, X., Jing, Y., & Wang, Z. Disruption of microalgal cells using high-frequency focused ultrasound. *Bioresource technology*, 153, 315-321 (2014)
- Wu, X., & Mason, T. J. Evaluation of power ultrasonic effects on algae cells at a small pilot scale. *Water*, 9(7), 470 (2017)
- Mason, T. & Pétierul, C. Ultrasound Processes. In *Advanced oxidation processes for water and wastewater treatment*. Parsons, S. (Ed.) (2004)
- Turpin, V., Pondaven, P., & Rincé, Y. A fast colorimetric assay to control growth of algal strains: Application to numeration of marine diatom cells. *Diatom Research*, 21(2), 407-413 (2006)
- Lichtenthaler, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods in enzymology* ( Vol. 148, pp. 350-382) Academic Press (1987)
- Wang, H., & Joseph, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free radical biology and medicine*, 27(5-6), 612-616 (1999)
- Vavilin, D. V., Ducruet, J. M., Matorin, D. N., Venediktov, P. S., & Rubin, A. B. . Membrane lipid peroxidation, cell viability and photosystem II activity in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* subjected to various stress conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 42(3), 233-239 (1998)
- Okamoto, O. K., Pinto, E., Latorre, L. R., Bechara, E. J. H., & Colepicolo, P. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 40(1), 18-24 (2001)
- Li, H. B., Cheng, K. W., Wong, C. C., Fan, K. W., Chen, F., & Jiang, Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry*, 102(3), 771-776 (2007)
- Grace, S. C., & Logan, B. A. Acclimation of foliar antioxidant systems to growth irradiance in three broad-leaved evergreen species. *Plant physiology*, 112(4), 1631-1640 (1996)
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139 (1974)
- Sokal, R., Rohlf, F. Introducción a la Bioestadística. Editorial Reverté, Barcelona, España, 322 pp. (1999)
- Mann, D.G. The species concept in diatoms. *Phycologia*. 36: 437-495 (1999)