Evaluación de la eficiencia de eliminación e inactivación de cianobacterias y degradación de cianotoxinas usando ultrasonido

Jinna Marcela Loaiza González

Tesis de maestría presentada para optar al título de Magíster en Gestión Ambiental

Director
Gustavo Antonio Peñuela Mesa, Doctor (PhD) en Química Ambiental
Codirectora
Ainhoa Rubio Clemente, Doctor (PhD) en Ingeniería Ambiental y Ciencias de la Salud

Universidad de Antioquia
Facultad de Ingeniería
Maestría en Gestión Ambiental
Medellín, Antioquia, Colombia
2023

Cita	(Loaiza González, 2023)
Referencia **Estilo APA 7 (2020)**	Loaiza González, J. M. (2023). *Evaluación de la eficiencia de eliminación e inactivación de cianobacterias y degradación de cianotoxinas usando ultrasonido* [Tesis de maestría]. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

creative commons BY NC SA

Maestría en Gestión Ambiental.

Grupo de Investigación Diagnóstico y Control de la Contaminación.

Sede de Investigación Universitaria (SIU).

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
Vicerrectoría de Docencia

Sistema de Bibliotecas

Centro de Documentación Ingeniería (CENDOI)

Repositorio Institucional: http://bibliotecadigital.udea.edu.co

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS 5
LISTA DE TABLAS 6
LISTA DE GRÁFICAS 6
Resumen 7
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 8
1.1. Capacidad de flotabilidad 9
1.2. Aplicación de ultrasonido 9
2. OBJETIVOS 12
2.1. Objetivo general 12
2.2. Objetivos específicos 12
3. MARCO TEÓRICO 12
3.1. Generalidades de los embalses 12
3.2. Eutrofización y calidad del agua 13
3.3. Cianobacterias 14
3.4. Cianotoxinas y sus efectos adversos 16
3.4.1. Hepatotoxinas 16
3.4.2. Neurotoxinas 18
3.4.3. Dermatotoxinas 18
3.5. Influencia de los parámetros de sonicación 18
3.5.1. Frecuencia y potencia 19
3.5.2. Tiempo de exposición 19
4. METODOLOGÍA 20
4.1. Zona de estudio 21
4.2. Recolección de muestras 21
4.3. Ensayos sonoquímicos 24
4.4. Diseño experimental 25
5. CAPÍTULO 1: CARACTERIZACIÓN DEL CUERPO DE AGUA 27
5.1. INTRODUCCIÓN 27
5.2. METODOLOGÍA 28
5.3. RESULTADOS 32
5.3.1. Parámetros de calidad del agua 32
5.3.2. Identificación de fitoplancton y zooplancton 33

5.3.3. Índices de estructura de comunidades 40
5.4. DISCUSIÓN 40
5.5. CONCLUSIONES 43
6. CAPÍTULO 2: EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE ELIMINACIÓN E INACTIVACIÓN DE CIANOBACTERIAS USANDO ULTRASONIDO 44
6.1. INTRODUCCIÓN 44
6.2. METODOLOGÍA 45
6.3. RESULTADOS 47
6.3.1. Conteo de cianobacterias 47
6.3.2. Citometría de flujo 48
6.3.3. Pruebas de sedimentación 50
6.3.4. Análisis de superficie de respuesta 53
6.4. DISCUSIÓN 55
6.5. CONCLUSIONES 58
7. CAPÍTULO 3: EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE DEGRADACIÓN DE CIANOTOXINAS USANDO ULTRASONIDO 59
7.1. INTRODUCCIÓN 59
7.2. METODOLOGÍA 60
7.2.1. Reactivos 61
7.2.2. Extracción y concentración 61
7.2.3. Identificación y cuantificación 62
7.3. RESULTADOS 63
7.4. DISCUSIÓN 65
7.5. CONCLUSIONES 67
8. REFERENCIAS 68
9. AGRADECIMIENTOS 77
10. ANEXOS 78
10.1. Formato de captura de datos de campo 78
10.2. Lista de chequeo de muestreo 80
10.3. Carta de ingreso de muestras, tipo de recipientes y preservación 81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Factores que condicionan la presencia de floraciones algales..... 9
Figura 2. Rango de frecuencias del ultrasonido.....10
Figura 3. Escenarios tras la aplicación de ultrasonido: a) estructura celular intacta; b) ruptura de la vacuola de gas; c) lisis celular.....10
Figura 4. Algunos ejemplares de diferentes morfologías de cianobacterias: A-B: *Microcystis aeruginosa*, C: *Planktolyngbya contorta*, D: *Raphidiopsis curvata*, E: *Planktolyngbya subtilis*, F: *Raphidiopsis mediterranea*, G-I: *Cylindrospermopsis raciborskii*, K: *Anabaenopsis circularis*, L: *A. arnoldii*, J, M: *Anabaena spiroides*, N: *Nodularia spumigena*.....15
Figura 5. Estructura química de las microcistinas. 17
Figura 6. Desarrollo de actividades para alcanzar los objetivos planteados. 20
Figura 7. Recorrido del río Porce y ubicación conjunta de los embalses Porce II y III. 21
Figura 8. Aspecto del embalse Porce II durante el premuestreo 26-11-2021..... 22
Figura 9. Nivel del agua en la presa, al momento del muestreo en el embalse Porce II..... 22
Figura 10. Sitio de muestreo con afloramiento de cianobacterias 02-09-2022. 23
Figura 11. Ubicación espacial del sitio de muestreo, represa embalse Porce II, sector el Mango (6° 48’ 30,6’’ N - 75° 8’ 43,2’’ W - 942,7 msnm)..... 24
Figura 12. Equipo de ultrasonido de baja frecuencia. 25
Figura 13. Diseño experimental para los ensayos de eliminación e inactivación de cianobacterias y degradación de cianotoxinas..... 26
Figura 14. Llegada del río Porce al embalse Porce III. 28
Figura 15. Procedimiento de recolección de muestras y análisis *in situ*..... 29
Figura 16. Uso de red cónica para el muestreo de fitoplancton y zooplancton. 30
Figura 17. Comunidad planctónica observada en el microscopio a 40X..... 30
Figura 18. Microscopio invertido Boeco y cámara de Sedgwick-Rafter.....31
Figura 19. Visualización de diferentes tipos de colonias de *Microcystis* spp., en el embalse Porce II.....37
Figura 20. Microscopio óptico Nikon y cámara de Neubauer..... 45
Figura 21. Equipo CytoFLEX y kit LIVE/DEAD BacLight..... 46
Figura 22. Tamaño de las colonias de *Microcystis* spp. (40X): A: Control sin sonicar, B: Potencia mínima (10 W/30 min), C: Potencia máxima (50 W/30 min), D: Células disgregadas (50 W/30 min) (400X).....47
Figura 23. *Microcystis* spp. (1000X): A: Detalle de las vacuolas de gas en la célula sin sonicar, B: Aspecto de la célula tras sonicar, C: Colonia con células sin sonicar, D: Colonia con células afectadas tras la sonicación (50 W/30 min), E: Colonia con células afectadas tras la sonicación (10 W/30 min) (400X).....51
Figura 24. Pruebas de sedimentación transcurridas 48 h de los ensayos de sonicación, bajo diferentes potencias y tiempos de exposición de 0, 5, 10, 20 y 30 min, respectivamente: A: Potencia mínima (10 W), B: Potencia media (30 W), C: Potencia máxima (50 W)..... 52
Figura 25. Prueba de sedimentación transcurridas 72 h del ensayo de sonicación, bajo la potencia mínima (10 W) y tiempos de exposición de 0, 5, 10, 20 y 30 min, respectivamente..... 53
Figura 26. Superficie de respuesta estimada para la eliminación (%) utilizando el proceso de sonicación: frecuencia = 40 kHz; tiempo de reacción = 10, 20, 30 min; potencia = 10, 30, 50 W. 54
Figura 27. Diagrama de Pareto estandarizado para la eliminación (%).....55
Figura 28. Equipo UHPLC/MS/MS. 60

Figura 29. Proceso de filtración de las muestras. 61
Figura 30. Montaje del proceso SPE. 62

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. *Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de las muestras de agua superficial provenientes del embalse Porce II, Antioquia.* 32
Tabla 2. *Fitoplancton presente en el embalse Porce II, Antioquia.* 33
Tabla 3. *Zooplancton presente en el embalse Porce II, Antioquia.* 38
Tabla 4. *Índices de estructura de comunidades del embalse Porce II, Antioquia.* 40
Tabla 5. *Estado trófico en relación a las concentraciones de nitrógeno y fósforo en el agua.* 41
Tabla 6. *Eficiencia de eliminación de células y matriz DOE mediante el proceso de sonicación.* 53
Tabla 7. *ANOVA para el modelo desarrollado que describe la eliminación de células mediante el proceso de sonicación.* 53
Tabla 8. *Concentración de cianotoxinas en el embalse Porce II, 26-11-2021* 63
Tabla 9. *Concentración de cianotoxinas en el embalse Porce II, 02-09-2022.* 63

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Reducción de colonias bajo diferentes potencias a 40 kHz. 48
Gráfica 2. Eliminación de cianobacterias bajo diferentes potencias a 40 kHz. 48
Gráfica 3. Recuento celular bajo diferentes potencias a 40 kHz. 49
Gráfica 4. Recuento de células vivas y muertas bajo diferentes potencias a 40 kHz. 49
Gráfica 5. Viabilidad celular bajo diferentes potencias a 40 kHz. 50
Gráfica 6. Degradación de cianotoxinas bajo la potencia mínima (10 W) a 40 kHz. 64
Gráfica 7. Degradación de cianotoxinas bajo la potencia media (30 W) a 40 kHz. 64
Gráfica 8. Degradación de cianotoxinas bajo la potencia máxima (50 W) a 40 kHz. 64

Resumen

Las floraciones de cianobacterias han sido ampliamente estudiadas ya que estos organismos pueden producir metabolitos bioactivos y tóxicos, conocidos como cianotoxinas. Las cianobacterias están constituidas por una gran variedad de géneros y especies, cuyos mecanismos fisiológicos de intoxicación son variados; por lo que constituyen un grave problema ambiental con serias repercusiones en la salud humana y de los seres vivos. Adicionalmente, la presencia de cianobacterias y, en consecuencia, la producción de cianotoxinas, ha aumentado en extensión y frecuencia en todo el mundo; por lo tanto, el riesgo asociado con la presencia de estos microorganismos y sus toxinas se han convertido en un tema de gran preocupación. Por otro lado, es importante señalar que los procesos convencionales con los que operan las instalaciones de tratamiento de agua son ineficientes para su eliminación y/o degradación dado que las cianotoxinas son solubles en agua y persistentes. En este sentido, se hace necesaria la aplicación de tecnologías alternativas a los sistemas de tratamiento tradicionales de potabilización con el fin de obtener un agua de buena calidad para el consumo humano. En el presente trabajo, se empleó el ultrasonido de baja frecuencia, como proceso de oxidación avanzada, para eliminar e inactivar las cianobacterias y degradar las cianotoxinas provenientes de un embalse colombiano al Nordeste de Antioquia, evaluando por medio de microscopía, citometría y cromatografía, la eficiencia del proceso de sonicación, usando diferentes potencias (10, 30 y 50 W) y tiempos de exposición (5, 10, 20 y 30 min) bajo una frecuencia fija de 40 kHz. De este modo, se comprobó que los parámetros de ultrasonicación resultaron ser eficaces para el control de las floraciones de cianobacterias, más no para la degradación de cianotoxinas en altas concentraciones. De manera que, se alcanzaron altos porcentajes de reducción de la densidad celular, de hasta un 74,9% y, así mismo, se logró la sedimentación de las células en tan solo 5 min y su efecto se sostuvo significativamente durante las siguientes 72 h. Tanto la potencia como el tiempo de exposición tuvieron un efecto significativo y directamente proporcional en la eliminación de células cianobacterianas tras el proceso de sonicación. Por otra parte, no se obtuvieron tasas de degradación significativas de MCs luego de 30 min de tratamiento, debido a las elevadas concentraciones, de hasta 2.595,42 μg/L para MC-LR. Adicionalmente, los valores obtenidos de los índices de estructura de comunidades, indican que el embalse Porce II es un ambiente muy contaminado y con una alta dominancia de *Microcystis* spp. En este sentido, merece mayor atención la evaluación de riesgos, la implementación de programas de monitoreo y los esfuerzos de mitigación en embalses, independientemente de su uso.

Palabras clave: Cianobacteria, cianotoxina; afloramiento; microcistina–LR; potabilización del agua; proceso avanzado de oxidación (PAO); ultrasonido de baja frecuencia, orgánulo celular.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las cianobacterias, también denominadas algas verde-azuladas, son organismos procariotas, unicelulares y fotosintéticos presentes en diversos ecosistemas acuáticos (Gaysina et al., 2019). Su presencia se extiende a ambientes lénticos, tanto de agua dulce como salobre, desde embalses, lagos y lagunas, hasta aguas costeras; en especial, en zonas del trópico, donde su crecimiento es promovido por las altas temperaturas y la alta luminosidad, así como la abundancia de nutrientes (Glibert, 2020; Paerl & Barnard, 2020). En consecuencia, el cambio climático junto con la eutrofización de los cuerpos de agua ha llevado a un aumento desmedido de la cantidad de fitoplancton, dando lugar a un fenómeno conocido como afloramiento (Paerl & Otten, 2013; Wells et al., 2015). Dado que ciertas cianobacterias producen toxinas, denominadas cianotoxinas, esta explosión demográfica supone un riesgo tanto para la salud humana como animal, e incluso puede llegar a producir la muerte; especialmente si habitan el mismo ambiente o si dichas aguas son utilizadas para riego, recreación o abastecimiento de la población sin llevar a cabo un tratamiento previo de remoción eficiente (Paerl et al., 2018; Sedan & Andrinolo, 2011; Singh & Babele, 2020). Además de su alta toxicidad, cabe destacar su capacidad de bioacumulación (Stewart et al., 2008; Umehara et al., 2017) y biomagnificación (Crettaz-Minaglia et al., 2017); siendo la microcistina-LR (MC-LR) la variante más tóxica y ampliamente distribuida (Caramés, 2016).

Para el agua potable, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado un valor guía provisional de 1 μg/L total de MC-LR, sugiriendo una ingesta diaria tolerable para MC-LR de 0,04 μg/kg de peso corporal (WHO, 2011). No obstante, las concentraciones en los cuerpos de agua con cepas potencialmente tóxicas en ocasiones superan este valor. Incluso límites más estrictos (0,1-0,3 μg/L) han sido implementados por algunas agencias reguladoras, como la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US-EPA, por sus siglas en inglés) en el estado de Ohio, para niños menores de 6 años y poblaciones sensibles (Buratti et al., 2017), adoptando su propia regulación sobre la seguridad del agua para consumo, en respuesta a las directrices de la OMS. Dicha problemática ha aumentado en extensión y frecuencia en todo el mundo (Brooks et al., 2016), en gran medida debido a la falta de inclusión de sistemas de monitoreo (Gaget et al., 2017), y sobre todo a la falta de estudios sobre cianopéptidos más allá de las microcistinas (MC) (Janssen, 2019), y la predominancia además de otro tipo de congéneres, como la MC-RR y la MC-YR (Li et al., 2017). En adición, la falta de acciones preventivas encaminadas a la reducción de descargas a fuentes hídricas, y evidentemente, el impacto del calentamiento global, favorecen condiciones óptimas para el crecimiento de estos microorganismos (Paerl et al., 2016), como se observa en la Figura 1. En contraste, los procesos convencionales de potabilización, generalmente implican la retención de las células cianobacterianas, más no la degradación efectiva de las toxinas (He et al., 2016). De hecho, la desinfección con cloro, compromete la integridad de las células sin garantizar su eliminación, provocando la lisis celular y, por consiguiente, la liberación de toxinas intracelulares al medio (Merel, et al., 2013a). Es por esto que en los últimos años se han propuesto nuevas técnicas como los procesos avanzados de oxidación (PAO); entre ellos el ultrasonido (US), el cual sirve para degradar las cianotoxinas y realizar el control de la proliferación de cianobacterias (Park et al., 2017).

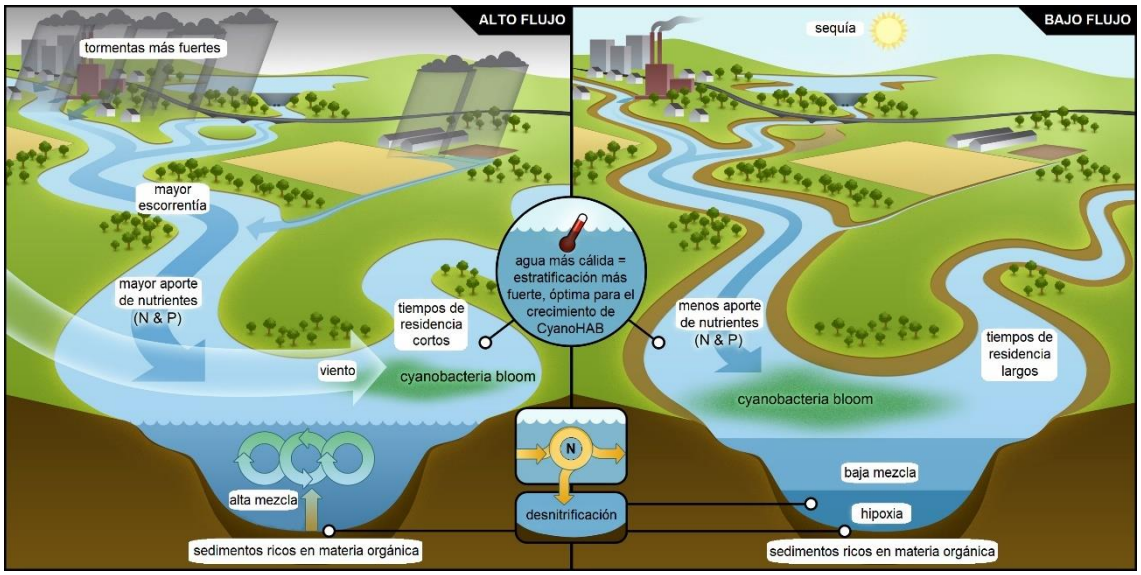


Figura 1. Factores que condicionan la presencia de floraciones algales.
Adaptado de: (Paerl et al., 2016).

1.1. Capacidad de flotabilidad

Múltiples estudios confirman los riesgos que implica la presencia de cianobacterias en los cuerpos de agua (Gobler, 2020) debido a su capacidad para producir cianotoxinas. Así mismo, se ha evidenciado que estas especies formadoras de afloramientos pueden regular su flotación y su posición en la columna de agua mediante vacuolas de gas, lo que representa una ventaja competitiva frente a otras especies del fitoplancton (Cobo, 2015; Walsby, 1992), favoreciendo su proliferación. Cabe destacar que las vacuolas de gas son cavidades huecas que se encuentran en muchos procariotas acuáticos, incluyendo cianobacterias, bacterias fotosintéticas anoxigénicas y halobacterias. Cada vacuola está formada por filas de varias vesículas gaseosas individuales, que son cilindros huecos intracelulares cubiertos por proteínas. La función de las vacuolas de gas es mantener la flotabilidad, de modo que las células puedan permanecer en el agua a la profundidad adecuada para recibir suficiente cantidad de oxígeno (O_2), radiación solar y nutrientes (Den Uyl et al., 2021). La aplicación de ultrasonido rompe estas vacuolas de gas y facilita la sedimentación de las células cianobacterianas, permitiendo que éstas permanezcan en las zonas más profundas de la columna de agua en los embalses donde las condiciones de luz y O_2 son limitadas, interrumpiendo sus funciones vitales como la fotosíntesis y la absorción de nutrientes, por lo que eventualmente morirán (Li et al., 2020).

1.2. Aplicación de ultrasonido

La sedimentación de las células cianobacterianas es posible mediante la producción de una serie de ondas mecánicas, cuya frecuencia está por encima del valor límite audible de 20 kHz (ver Figura 2), generando burbujas de cavitación que colapsan y hacen que se alcancen de forma localizada temperaturas y presiones elevadas, logrando una reducción en el crecimiento de algas por medio de la destrucción estructural y funcional de las células.

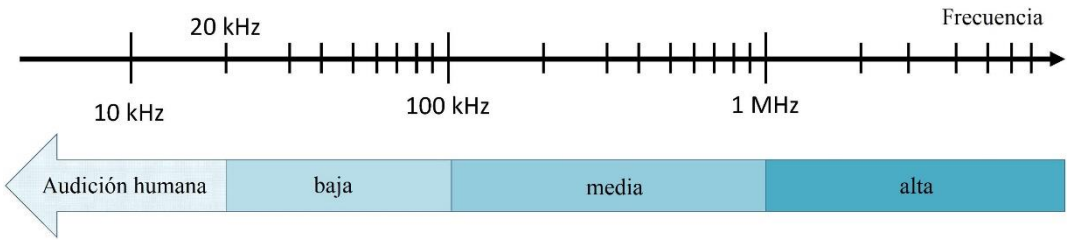


Figura 2. Rango de frecuencias del ultrasonido.
Adaptado de: (Liu et al., 2022).

Durante el proceso de sonicación; es decir, de ondas de ultrasonido, se destruye la vacuola de gas por rompimiento de la capa de proteína que la conforma, debido al colapso de las burbujas de cavitación, más no por las reacciones químicas que se desencadenan en el agua al generarse radicales libres (Kurokawa et al., 2016), tales como los radicales hidroxilo ($HO^{\cdot}$); siendo favorecido el rompimiento por la frecuencia empleada en el proceso de sonicación (Rajasekhar et al., 2012a). A bajas frecuencias, pero alta potencia, la cavitación acústica conduce principalmente a efectos mecánicos o fuerzas de cizallamiento elevadas que pueden provocar la ruptura celular. Por otro lado, a altas frecuencias se produce mayor cantidad de radicales libres y, por lo tanto, el daño químico a las células es significativo (Wu et al., 2012). La frecuencia del ultrasonido debe ser tal, que destruya la estructura celular interna de la cianobacteria más no la externa, ya que podría producir la lisis celular y aumentar la cantidad de cianotoxinas extracelulares en el ambiente acuático (Greenstein et al., 2021; Kong et al., 2019), como se ilustra en la Figura 3. De este modo, la efectividad estará dada por tres parámetros operativos importantes para el uso de la sonicación como estrategia de control de estas algas verde-azuladas: frecuencia, potencia (o intensidad) y duración de la exposición (Rajasekhar et al., 2012a). Estudios recientes sugieren que distintas especies de algas pueden requerir diferentes frecuencias de operación para maximizar la inhibición de su crecimiento (Purcell et al., 2013; Schneider et al., 2015). Se sabe que el ultrasonido es efectivo para la eliminación de toxinas como las MCs producidas por *Microcystis aeruginosa* (Park et al., 2017), que resulta ser la variante más estudiada, dada su alta recurrencia y toxicidad (Pamplona-Silva et al., 2018).

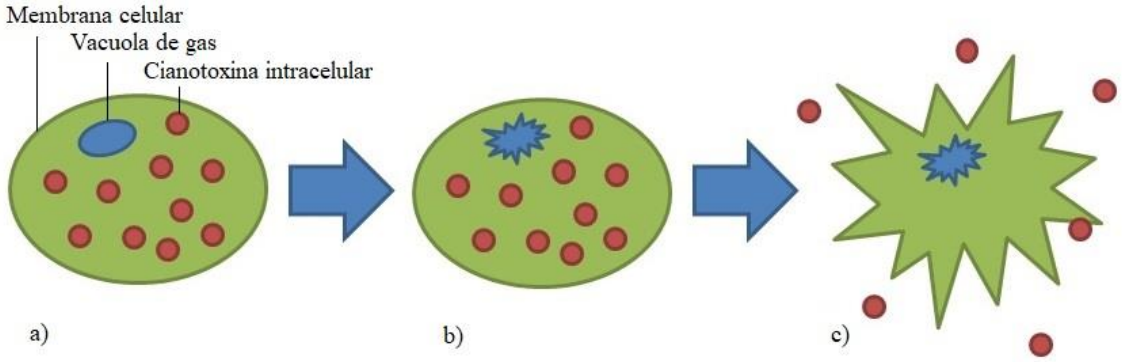


Figura 3. Escenarios tras la aplicación de ultrasonido: a) estructura celular intacta; b) ruptura de la vacuola de gas; c) lisis celular.
Fuente: elaboración propia.

A pesar de que la aplicación de ultrasonido induce el colapso de las vacuolas de gas, y consigo la precipitación de las cianobacterias, logrando inhibir su crecimiento (Joyce et al., 2010), las

vacuolas pueden nuevamente ser regeneradas en un tiempo relativamente corto después de que cesa la aplicación del ultrasonido (Ahn et al., 2003; Lee et al., 2000; Li et al., 2020). Según los resultados obtenidos por Rodríguez-Molares et al. (2014), el proceso de sedimentación es significativo en los dos primeros días después de la ultrasonicación, un lapso de tiempo que podría ser suficiente para que las células desciendan a un nivel en el que la intensidad de la luz no sea suficiente para reformar las vesículas de gas y el proceso de sedimentación sea irreversible. Sin embargo, cada especie posee cierta inercia; es decir, mayor o menor tasa de hundimiento o fuerza de sedimentación (Rodriguez-Molares et al., 2014). Adicionalmente, la sonicación no es el único método para eliminar las cianobacterias por cavitación. Recientemente, la cavitación de chorro hidráulico ha sido reportado como una alternativa al ultrasonido para la eliminación de algas, de igual manera, se ha evidenciado que esta técnica permite destruir también las vesículas de gas (Jančula et al., 2014; Li et al., 2015).

Sin embargo, aunque la literatura reporta que bajo diferentes pruebas de laboratorio, el ultrasonido es efectivo para el control de algas (Purcell et al., 2013; Villanueva et al., 2015), es claro que sus condiciones de ensayo pueden no representar las condiciones de campo (Park et al., 2017). En este sentido, deben ser considerados dentro del desarrollo experimental, las condiciones ambientales y los valores de los parámetros fisicoquímicos de calidad del agua, los cuales son de gran relevancia como se mostró en la Figura 1. Así mismo, resulta de suma importancia para aplicaciones futuras a gran escala evaluar si dicha tecnología podría considerarse como una alternativa óptima a los procesos convencionales con los que operan las plantas de tratamiento de aguas y si, realmente, proporcionaría una mejora significativa de la calidad de las aguas, ejerciendo un control del crecimiento de las cianobacterias a largo plazo y eliminando los efectos nocivos causados por estos microorganismos. Si bien, es necesario tener en cuenta limitantes, tales como los rangos de alcance del ultrasonido y la masa algal y/o concentración de toxinas en el reservorio, especialmente cuando en la actualidad contamos con aplicaciones regionales que se han venido implementando como medidas de control en sistemas de abastecimiento de agua potable tan importantes para la ciudad de Medellín, como lo es el Embalse la Fe (El Retiro, Antioquia). Fue aquí donde Empresas Públicas de Medellín (EPM) optó en 2015 por la aplicación de ultrasonido de baja frecuencia, mediante la instalación de ocho equipos MPC-Buoy; acción que fue replicada en 2017 para el Embalse Riogrande II (Entrerrios, Antioquia), luego Guatapé y finalmente en 2019, instaló 6 sistemas en su embalse de generación hidroeléctrica, Porce II, y 4 sistemas más en Porce III (LGSONIC, 2020). Es primordial, por tanto, ampliar el conocimiento en este campo, y profundizar acerca de la efectividad del tratamiento y su optimización.

Bajo este escenario, el presente estudio busca observar diferentes condiciones de operación, centradas en la variación de la potencia y el tiempo de exposición del ultrasonido, y determinar: ¿bajo qué rangos a) permanece intacta la membrana celular, b) se da el colapso de la vacuola de gas y c) ocurre la lisis celular de las cianobacterias y, en este último caso, es posible la degradación de las toxinas extracelulares? (ver Figura 3). Con ello, se pretende tener un acercamiento hacia la viabilidad de la implementación de este proceso avanzado de oxidación en el tratamiento de aguas contaminadas con cianobacterias.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar la eficiencia de eliminación e inactivación de cianobacterias tóxicas, y la degradación de sus toxinas mediante la aplicación de ultrasonido de baja frecuencia.

2.2. Objetivos específicos

A continuación, se mencionan los objetivos específicos planteados que permitieron la consecución del objetivo general:

- Evaluar la calidad fisicoquímica del agua y la estructura de la comunidad planctónica del sitio de afloramiento de cianobacterias en un embalse eutrofizado de la región.
- Evaluar el impacto de los diferentes parámetros de sonicación, en la estructura y funcionamiento de las células cianobacterianas.
- Determinar la influencia de los diferentes parámetros de sonicación, en la eficiencia de degradación de las cianotoxinas.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Generalidades de los embalses

En Colombia, debido a su potencial hídrico y orográfico, la mayoría de los embalses cumplen con una función de generación energética. Sin embargo, pueden ser diseñados y construidos para cumplir otros propósitos tales como el abastecimiento de agua para el acueducto y riego, uso industrial y como recurso recreativo o paisajístico, proporcionando servicios de gran importancia y beneficio en épocas de sequía (Zhang et al., 2022). Los embalses son esenciales para el suministro del agua. Sin embargo, intervenciones de tal magnitud generan cambios o alteraciones en el funcionamiento del ecosistema y modifican la estructura de las comunidades (Galizia Tundisi, 2018).

De forma natural, los embalses tienden a acumular sedimentos, y a que sus aguas contengan cada vez mayores concentraciones de nutrientes (Schleiss et al., 2016). Según la concentración de nutrientes en el agua, estos sistemas lénticos pueden ser oligotróficos, con escasez de nutrientes, los cuales con el paso del tiempo acaban siendo eutróficos o ricos en nutrientes (Simões et al., 2015). Si bien, perturbaciones antrópicas, incluyendo vertimientos urbanos e industriales y actividades agrícolas, ganaderas y forestales, aceleran estos procesos y, generalmente, añaden elementos contaminantes (Khatri & Tyagi, 2015).

Así, la interfaz agua/sedimento es crucial en la implementación de estrategias de control. Más aún, ahora que se conoce la existencia de cianobacterias tanto bentónicas como pelágicas (Buratti et al., 2017), y el riesgo adicional por la acumulación de toxinas, puesto que pueden adsorberse en partículas suspendidas en la columna de agua y depositarse en el sedimento, donde pueden llegar a acumularse y posteriormente provocar su resuspensión, ya sea por medio de factores físicos como los vientos en reservorios poco profundos o factores biológicos como la biodegradación (Santos et al., 2020).

Dada su recurrencia en cuerpos de agua, el Grupo de Diagnóstico y Control de la Contaminación (GDCON), ha venido realizando diferentes estudios de investigación, desde el año 2015, en los que se ha identificado la presencia de florecimientos de cianobacterias junto con la detección de cianotoxinas, en embalses como Abreo Malpaso, Peñol – Guatapé y Playas, ubicados en el oriente antioqueño. De este modo, en los 3 embalses se evidenció que la población de cianobacterias estaba dominada en un 45,5% por la picocianobacteria *Synechococcus rubescens*, seguida por *Microcystis aeruginosa*, y se llegó a la conclusión de que las variables fisicoquímicas que determinaron fuertemente su presencia fueron carbono orgánico disuelto (COD), fósforo soluble, oxígeno disuelto y potencial de oxidación-reducción (ORP) (Múnera Porras, 2017). Adicionalmente, la cuantificación de cianotoxinas, mostró concentraciones considerables de MCs, por encima de 1 μg/L en las aguas de los embalses Abreo Malpaso y Peñol (León Salazar, 2017). Lo anterior, resalta la importancia de su monitoreo y control en reservorios de la región.

3.2. Eutrofización y calidad del agua

La calidad ecológica de un embalse se mide a partir de la combinación de parámetros físicos, químicos y biológicos, integrando sus tres subsistemas interactuantes, las aguas aportadas por los ríos afluentes, las aguas embalsadas y los sedimentos del embalse (Navarro et al., 2010). En el caso de que se utilice para el abastecimiento de la población, las aguas deben ser oligotróficas y no contener sustancias nocivas para la salud humana, como metales pesados, pesticidas, toxinas u otros elementos contaminantes, no obstante, en otros casos la presencia de dichos compuestos no deja de representar un riesgo para el ecosistema (Acuña-Alonso et al., 2020).

En un principio, los períodos de sequía, y el consiguiente descenso de las reservas hídricas, solían ser las únicas situaciones de alerta para las centrales de abastecimiento: cuánta agua hay y cuánta se necesita (Navarro et al., 2010). Sin embargo, han sido precisamente dichas sequías las que han hecho aflorar la preocupación por la calidad de las aguas represadas y su debida gestión; más aún, cuando desde los años sesenta, el uso extendido de detergentes con fosfatos y el aumento de la producción agrícola han venido provocando, cada vez con mayor frecuencia, episodios de eutrofización (Alvarez Dalinger et al., 2023). La abundancia de fósforo desequilibra los balances de nutrientes, lo que provoca la proliferación excesiva de fitoplancton y otros problemas asociados como anoxia, mortandad de peces, aparición de algas tóxicas y malos olores, entre otros (Smith & Schindler, 2009; Xie et al., 2021). En este sentido, factores ambientales como la eutrofización, incluyendo condiciones de baja turbulencia y el estancamiento de agua, permiten la formación de floraciones, cuya alerta aumenta el interés por ahondar en la biología de estos sistemas. Incluso se ha proyectado, bajo escenarios futuros de calentamiento global, una reducción en el nivel del agua causada por las sequías, lo que agravará la eutrofización de los reservorios, conduciendo a una mayor biomasa y dominio de cianobacterias, especialmente en las regiones tropicales, reduciendo la cantidad y calidad del agua (Brasil et al., 2016; Burford et al., 2020; Solis et al., 2016).

Una floración algal o afloramiento es un fenómeno en el cual se produce biomasa significativamente, durante un corto periodo de tiempo, y se encuentra relacionado simultáneamente con una disminución de la diversidad del fitoplancton, principalmente, en ecosistemas acuáticos lénticos, cuyas condiciones ambientales, como el enriquecimiento por nutrientes, favorecen su aparición (Merel, et al., 2013a; You et al., 2022). Las cianobacterias son

grandes productoras de O_2, y muchas de ellas también son fijadoras eficientes de nitrógeno gaseoso (N_2) atmosférico, lo que las convierte en componentes ecosistémicos extremadamente importantes, las cuales incluso pueden llegar a formar una amplia gama de relaciones simbióticas (Gaysina et al., 2019). De allí, parte el hecho de que la función ecológica de las cianobacterias planctónicas sea similar al de las algas, al conjugar el proceso de la fotosíntesis oxigénica con una estructura celular típicamente bacteriana, que le confiere una alta resistencia. Así mismo, la producción de metabolitos secundarios extracelulares son una parte importante de la defensa de las algas contra la herbivoría, siendo determinantes en cuanto a la distribución y abundancia de especies dentro de las comunidades (Yunes, 2019).

En los embalses, es muy común la presencia de cianobacterias; el problema es que amenazan la estabilidad ecológica y la integridad de los ecosistemas acuáticos. Aparte de la producción de toxinas, disminuyen la claridad del agua y pueden aumentar localmente la temperatura del agua superficial; además, al morir, las floraciones aumentan la cantidad de materia orgánica, cuya descomposición conduce a la anoxia e hipoxia (Nowicka-Krawczyk et al., 2022). Adicionalmente, los embalses son muy susceptibles al cambio climático; la combinación del aumento de la temperatura del aire con la disminución de la precipitación, junto con un aumento de la temperatura del agua, intensifica la evaporación, aumentando así la concentración de contaminantes en los ecosistemas acuáticos (Gmitrowicz-Iwan et al., 2020; Luo et al., 2022). En consecuencia, el uso de índices tróficos para evaluar el estado de eutrofización, resulta bastante útil, ya que pueden reflejar la influencia antropogénica en la calidad del agua y el funcionamiento ecológico de ríos, lagos y embalses. Además, brindan información sobre cómo la disponibilidad de nutrientes y luz controla el desarrollo del fitoplancton y pueden servir como herramientas de monitoreo (Sá et al., 2021). De este modo, las regiones tropicales y subtropicales, asociadas a temperaturas más altas, son las más afectadas (Mowe et al., 2015), y así mismo, las floraciones de cianobacterias son cada vez más frecuentes e intensas, e incluso se espera que afecten áreas que actualmente no sufren dicha problemática (Alvarez Dalinger et al., 2023). En este sentido, se requiere mayores estudios que evidencien el estado trófico general de los embalses del país, y así, controlar el desarrollo de florecimientos y proteger los ecosistemas.

3.3. Cianobacterias

Las cianobacterias son fotoautótrofas, ampliamente distribuidas en todo el mundo. De hecho, desempeñan un importante papel como productoras primarias, a pesar de su impacto en los ecosistemas (Vidal et al., 2021). Su sorprendente éxito en la adaptación a hábitats tan diversos y variados, tanto en ambientes acuáticos como terrestres, además de su increíble capacidad de sobrevivir bajo condiciones extremas, se atribuye a su historia evolutiva, al ser uno de los organismos más antiguos del planeta (Gaysina et al., 2019). Representan, además, uno de los filamentos procariotas más diversos, desde el punto de vista morfológico y fisiológico (Buratti et al., 2017; Kaur, 2019). Los géneros más comunes en la formación de afloramientos son *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Nodularia*, *Microcystis, Oscillatoria, Planktothrix* y *Lyngbya;* y en menor proporción, los géneros *Gomphosphaeria, Coelosphaerium, Gloeotrichia* y *Nostoc* (Huisman et al., 2018). En la Figura 4, pueden observarse algunos de los ejemplares mencionados. Forman colonias lo suficientemente grandes como para verse a simple vista, mediante la producción de biofilm superficial y el cambio en la coloración del agua (Nowicka-Krawczyk et al., 2022). Aquellas con el potencial de causar efectos nocivos se conocen como

floraciones de algas nocivas (HAB, por sus siglas en inglés), las cuales pueden durar desde unos pocos días hasta meses (Carmichael, 2001; Stewart et al., 2008).

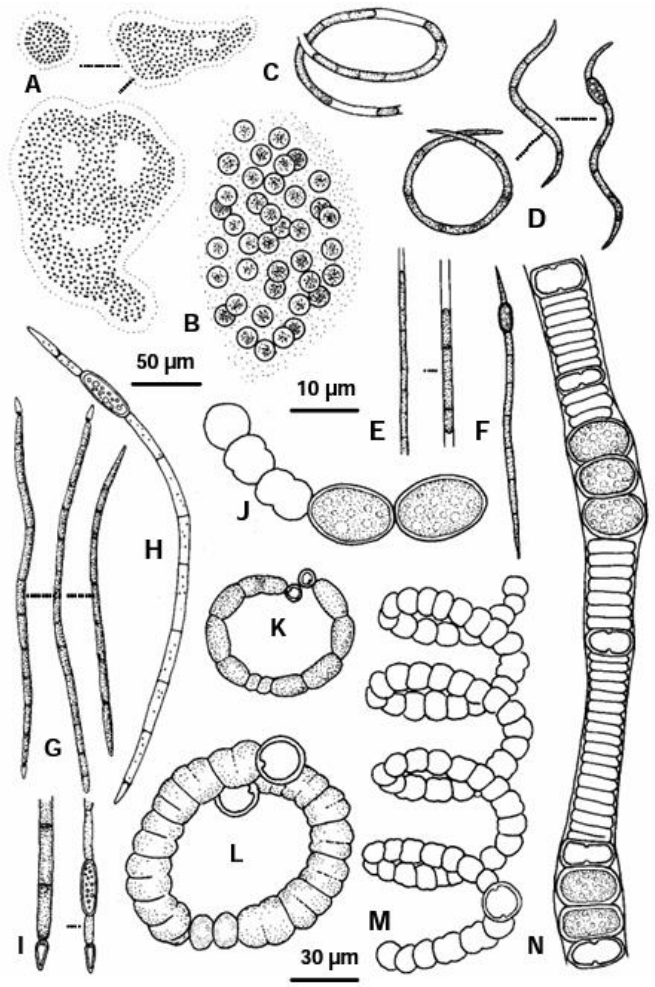


Figura 4. Algunos ejemplares de diferentes morfologías de cianobacterias: A-B: *Microcystis aeruginosa*, C: *Planktolyngbya contorta*, D: *Raphidiopsis curvata*, E: *Planktolyngbya subtilis*, F: *Raphidiopsis mediterranea*, G-I: *Cylindrospermopsis raciborskii*, K: *Anabaenopsis circularis*, L: *A. arnoldii*, J, M: *Anabaena spiroides*, N: *Nodularia spumigena.*

Tomado de: (Domitrovic & Forastier, 2005).

Sin embargo, la aparición de una floración de cianobacterias no indica necesariamente que haya producción de toxinas. Pueden existir múltiples genotipos de cianobacterias que producen toxinas mientras que otras no; o incluso su producción puede estar limitada por la influencia de ciertas condiciones ambientales (Dalu & Wasserman, 2018; Davis et al., 2009). Aún dentro de un afloramiento de una única especie puede haber una mezcla de cepas tóxicas y no tóxicas, e incluso algunas cepas pueden ser mucho más tóxicas que otras (Baker et al., 2002; Chorus & Bartram, 1999; Jacinavicius et al., 2019). Factores ambientales, como la temperatura, la intensidad de la luz, el pH, los nutrientes, la salinidad, la radiación ultravioleta, los metales traza y la presencia de demás contaminantes en general, pueden llegar a afectar las concentraciones de biomasa de algas, la capacidad fotosintética, además de la distribución de algas en los reservorios, la cual está sujeta a los flujos de agua, turbulencia o viento, que dificultan su control. No obstante, dichas condiciones que desencadenan o inhiben la producción de cianotoxinas, siguen siendo un área activa de investigación (Malik et al., 2020; Neilan et al., 2012).

3.4. Cianotoxinas y sus efectos adversos

Las cianotoxinas, a diferencia de otras sustancias químicas tóxicas, se encuentran usualmente contenidas dentro de las células cianobacterianas o unidas a ellas, y solo un pequeño porcentaje del total se halla disuelto en el agua, a menos que ocurra la lisis celular (Chorus & Bartram, 1999). Químicamente, las cianotoxinas pueden ser péptidos, aminoácidos, alcaloides y lipopolisacáridos, que actúan como endotoxinas responsables de su capacidad patógena (Yunes, 2019). A nivel mundial, un factor importante por el cual la proliferación masiva de cianobacterias repercute negativamente en el ambiente, se debe a que puede resultar en la acumulación de toxinas (Pham & Utsumi, 2018). En efecto, aunque la gran mayoría de productos dañinos cianobacterianos están confinados al interior de las células, estos finalmente se liberan en el agua circundante después de la muerte celular, ya sea natural o artificialmente inducida. Según la OMS, la exposición humana a cianobacterias y sus productos biológicamente activos trae consigo efectos de distinta gravedad (WHO, 2011). Sus efectos específicos dependen, además del tipo de cianotoxina, de la cantidad y la vía de exposición (Trevino-Garrison et al., 2015). En humanos, se han registrado pocos episodios de intoxicaciones letales o graves después de una exposición aguda o a corto plazo, probablemente debido a la apariencia y sabor desagradables del agua contaminada por floraciones de cianobacterias, impidiendo su ingesta hasta un nivel tóxico (Grattan et al., 2016); sin embargo, la exposición prolongada o crónica a niveles bajos, sigue siendo un problema crítico (Buratti et al., 2017).

Los mecanismos fisiológicos de intoxicación son variados, principalmente, reacciones hepatotóxicas, neurotóxicas, dermatotóxicas y citotóxicas; mediante la exposición a través de la ingesta directa o el contacto cutáneo (Malik et al., 2020). De todas las cianotoxinas, los péptidos cíclicos como microcistinas (MC) y nodularinas (NOD) son las más estables y resistentes a la degradación física y química (Merel et al., 2010), además de ser las más frecuentes y que representan un mayor riesgo a la salud humana (Chorus & Bartram, 1999), especialmente a través del suministro de agua potable y/o acumulación en la cadena alimentaria (Li et al., 2017).

3.4.1. Hepatotoxinas

Las hepatotoxinas afectan al hígado, se consideran probablemente las cianotoxinas más comunes, y conforman un grupo de compuestos estructuralmente diferentes que incluye más de 90 variantes de microcistina (MC), 9 variantes de nodularina (NOD) y 3 variantes de cilindrospermopsina (CYN) (Merel, et al., 2013b). Las MCs comparten una estructura general de heptapéptidos monocíclicos (ver Figura 5) que tiene la capacidad de resistir factores físicos y químicos (Malik et al., 2020); son producidas comúnmente por los géneros de cianobacterias *Microcystis* spp., *Oscillatoria* spp., *Nostoc* spp., *Anabaena* spp. y *Anabaenopsis* spp.; mientras las NOD son producidas principalmente por *Nodularia spumigena* en aguas salobres y las CYN por *Cylindrospermopsis raciborskii* en aguas dulces (Kaur, 2019).

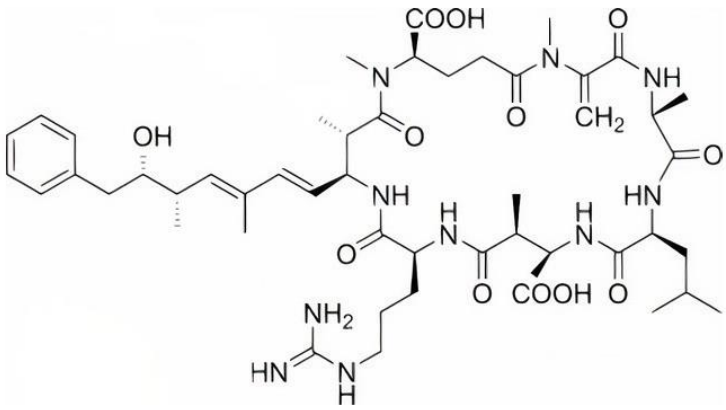


Figura 5. Estructura química de las microcistinas.
Tomado de: (Malik et al., 2020).

Las MCs inhiben las proteínas fosfatasas y generan estrés oxidativo en las células eucariotas (Su et al., 2020); son capaces de inducir afectaciones en el hígado, los riñones, el intestino, el cerebro, los pulmones, el corazón y los sistemas reproductivo e inmunitario (Massey et al., 2018). Así mismo, los efectos nocivos de otras variantes de MC parecen ser similares a los de la MC-LR, pero difieren en potencia; además de otros factores a tener en cuenta, como la dosis, la ruta de exposición y la intensidad y duración de la exposición a las toxinas cianobacterianas (Chen et al., 2018). De este modo, MC-LR es la variante más tóxica y ampliamente distribuida, considerada un promotor tumoral y potencial carcinógeno para animales y humanos; incluso esta toxina se clasifica como un potencial carcinógeno de clase 2B para humanos (Malik et al., 2020). Recientemente, Feng et al. (2020) confirmaron que la exposición a MC-LR en dosis bajas puede promover la proliferación de células de carcinoma hepatocelular humano (Feng et al., 2020).

El primer caso reconocido de toxicidad fatal en seres humanos por MC, tuvo lugar tras una sequía en febrero de 1996, donde 126 pacientes en una unidad de hemodiálisis en Caruaru (noreste de Brasil) desarrollaron signos y síntomas de neurotoxicidad aguda y hepatotoxicidad subaguda luego del uso de agua tratada inadecuadamente de un reservorio local con floraciones de cianobacterias, lo que provocó la muerte de 60 individuos (Pouria et al., 1998). Cabe destacar que la hemodiálisis representa una vía de exposición de alto riesgo, ya que al entrar directamente en la circulación las MCs pueden provocar síndromes clínicos fatales que van desde una enfermedad neurotóxica aguda hasta insuficiencia hepática rápidamente progresiva y fatal. Otro caso crítico de exposición, se da por medio de sistemas de riego o de consumo, abastecidos por cuerpos de agua naturales como estanques, embalses y lagos, donde las toxinas de las cianobacterias presentes en el agua pueden no solo afectar el crecimiento y desarrollo de los cultivos, sino también causar daños e incluso la muerte al beber agua o comer animales o plantas contaminados con MC, ingresando al cuerpo a través del tracto digestivo y causando diarrea, parálisis nerviosa, daño hepático y envenenamiento (Zhou et al., 2021). En una emergencia que ocurrió en el 2014 en Toledo, OH (Lago Erie, EE. UU.), provocó que las autoridades cerraran el suministro de agua de la ciudad debido a los niveles elevados de MC, al representar una amenaza para la salud pública (Davis et al., 2019).

3.4.2. Neurotoxinas

Las neurotoxinas afectan el sistema nervioso e incluyen principalmente 20 variantes de saxitoxina (STX) y 6 variantes de anatoxina (ANTX) (Merel, et al., 2013b). La ANTX-a es una neurotoxina muy potente y de acción rápida, conocida originalmente como factor de muerte muy rápida, debido a sus efectos letales en cuestión de minutos, llegando a registrarse muertes agudas en múltiples especies animales luego de la exposición a dicha cianotoxina. Su ocurrencia se da en aguas dulces y es producida por varios géneros de cianobacterias, incluidas *Anabaena* spp., *Aphanizomenon* spp., *Microcystis* spp., *Planktothrix* spp., *Raphidiopsis* spp., *Arthrospira* spp., *Cylindrospermum* spp., *Phormidium* spp., *Nostoc* spp. y *Oscillatoria* spp., mientras la ANTX-a(s) sólo se ha asociado con cepas de *Anabaena* spp. (Kaur, 2019; Malik et al., 2020).

Las STX también se encuentran en aguas dulces y son producidas por cianobacterias de los géneros *Anabaena* spp., *Aphanizomenon* spp., *Planktothrix* spp., *Cylindrospermopsis* spp., *Lyngbya* spp. y *Scytonema* spp. Altos niveles de exposición a estas toxinas pueden causar parálisis muscular aguda e insuficiencia respiratoria, y generalmente están relacionados con la ingestión de mariscos o peces que acumulan toxinas (Kaur, 2019; Malik et al., 2020). Por otro lado, la cianotoxina beta-N-metilamino-L-alanina (BMAA) aún no se ha estudiado extensamente, pero al parecer esta toxina puede ser producida por todos los grupos conocidos de cianobacterias (Merel, et al., 2013a).

3.4.3. Dermatotoxinas

Las dermatotoxinas inducen irritación de la piel y de las mucosas, así como reacciones alérgicas. Dentro de este grupo, se incluyen las apliasiatoxinas (APTXs) y las lingbiatoxinas (LTXs), las cuales son producidas principalmente por *Lyngbya majuscula*. Es de resaltar que esta especie de cianobacteria se ha detectado hasta el momento solamente en aguas marinas (Merel, et al., 2013a). Este tipo de toxinas, incluye múltiples pero mal caracterizados lipopolisacáridos (LPS), los cuales son constituyentes de la membrana de las cianobacterias y sólo exhiben toxicidad al ser liberados en el agua circundante como resultado de la lisis celular (Merel, et al., 2013b).

3.5. Influencia de los parámetros de sonicación

El impacto producido tras la aplicación de ultrasonido surge de efectos mecánicos, térmicos y químicos en el entorno (Dehghani, 2016). Una de las principales causas de la destrucción de las algas es la resonancia de burbujas provocada por la cavitación ultrasónica. Por otro lado, la generación de radicales libres como $HO^{\cdot}$ pueden oxidar los lípidos de la membrana celular; si bien, tienen poco efecto sobre la eliminación de las células algales (Kurokawa et al., 2016).

Existen tres parámetros operativos importantes que ameritan especial atención. Estos parámetros son: la frecuencia, la intensidad (o potencia) y la duración de la exposición a las ondas de ultrasonido (Rajasekhar et al., 2012a). A baja potencia, el impacto del ultrasonido en las células de las algas es menor. Así, su tasa de eliminación aumenta con el tiempo y la potencia, lo que sugiere que la entrada de energía de ultrasonido podría ser uno de los factores críticos (Peng et al., 2020). Sin embargo, el uso de una mayor energía ultrasónica, representa un mayor consumo energético, lo cual puede llegar a ser un limitante en el uso a gran escala. En este sentido, es fundamental determinar un rango adecuado de operación de dichos parámetros que permitan un desempeño óptimo, con el fin de eliminar las células algales y/o controlar su proliferación, al

mismo tiempo que se evite el impacto negativo en otros organismos acuáticos importantes para el ecosistema, se reduzca el consumo de energía y se evite la liberación de sustancias tóxicas intracelulares (Peng et al., 2020).

3.5.1. Frecuencia y potencia

En general, una mayor potencia y frecuencia de ultrasonido aceleran la tasa de eliminación de las células de las algas (Zhang, et al., 2006a). Las frecuencias ultrasónicas más altas son más efectivas para controlar el crecimiento de algas debido a su proximidad a la frecuencia de resonancia de las vacuolas de gas en las cianobacterias (Rajasekhar et al., 2012a). El aumento de la frecuencia de la sonicación también aumenta la producción de $HO\cdot$, de modo que la sonicación a frecuencias más altas puede inactivar y/o dañar las células de las algas por esta ruta, además de los efectos mecánicos del colapso de la cavitación (Joyce et al., 2010). Así, frecuencias más altas muestran una mayor eficiencia para la inhibición del crecimiento de cianobacterias (Rajasekhar et al., 2012b), ya que el efecto de frecuencias más bajas, depende exclusivamente de la acción de cizallamiento mecánico y la pirólisis térmica (Chen et al., 2020). Sin embargo, una frecuencia más alta también requiere más energía eléctrica para generar cavitación. En contraste, las frecuencias más bajas requieren menor energía pero mayor tiempo de aplicación para formar burbujas de cavitación que logren eliminar las cianobacterias de forma eficiente (Park et al., 2017). Aun así, los ajustes de baja frecuencia son capaces de inducir una cavitación más potente, lo que acelera las reacciones sonoquímicas; es decir, frecuencias más bajas y una mayor potencia de sonicación causan reacciones de cavitación más violentas (Zhang, et al., 2006a), por lo que una mayor potencia con una exposición de corto tiempo puede llegar a ser más eficiente energéticamente en comparación con una menor potencia con una exposición más prolongada (Park et al., 2019). No obstante, el aumento en la potencia ultrasónica puede llegar a aumentar el número de muertes de ciertas comunidades planctónicas (Chen et al., 2020). Por lo tanto, la frecuencia y la potencia son un factor clave de desempeño, y aunque se han estudiado rangos relativamente amplios para probar la eficiencia del ultrasonido, la combinación óptima para el control de algas cianobacterianas aún no está clara (Park et al., 2017).

3.5.2. Tiempo de exposición

El tiempo de exposición a las ondas de ultrasonido depende principalmente de la frecuencia, potencia, efecto deseado y de la escala de estudio (Rajasekhar et al., 2012a). Un tiempo de exposición más largo conduce a someterse en mayor medida a los efectos de la cavitación. No obstante, una excesiva intensidad y duración del ultrasonido pueden causar una alteración celular rápida y grave, lo que puede no ser deseable ya que podría conducir a la liberación de toxinas y demás compuestos intracelulares, amenazando la calidad del agua (Tan et al., 2018). Así mismo, una inadecuada intensidad y exposición no lograría la inactivación e inhibición deseadas. En su lugar, se recomienda una exposición breve y repetida, ya que tan solo inhibe la propagación celular (Tang et al., 2004). Por lo tanto, es muy importante también establecer la duración óptima para la sonicación.

4. METODOLOGÍA

En la Figura 6, se resume por medio de un diagrama, el desarrollo metodológico que se implementó para llevar a cabo el alcance de cada uno de los objetivos específicos planteados y, por tanto, la consecución del objetivo general. Se usó el mismo diseño experimental tanto para la sonicación de las cianobacterias como para las cianotoxinas.

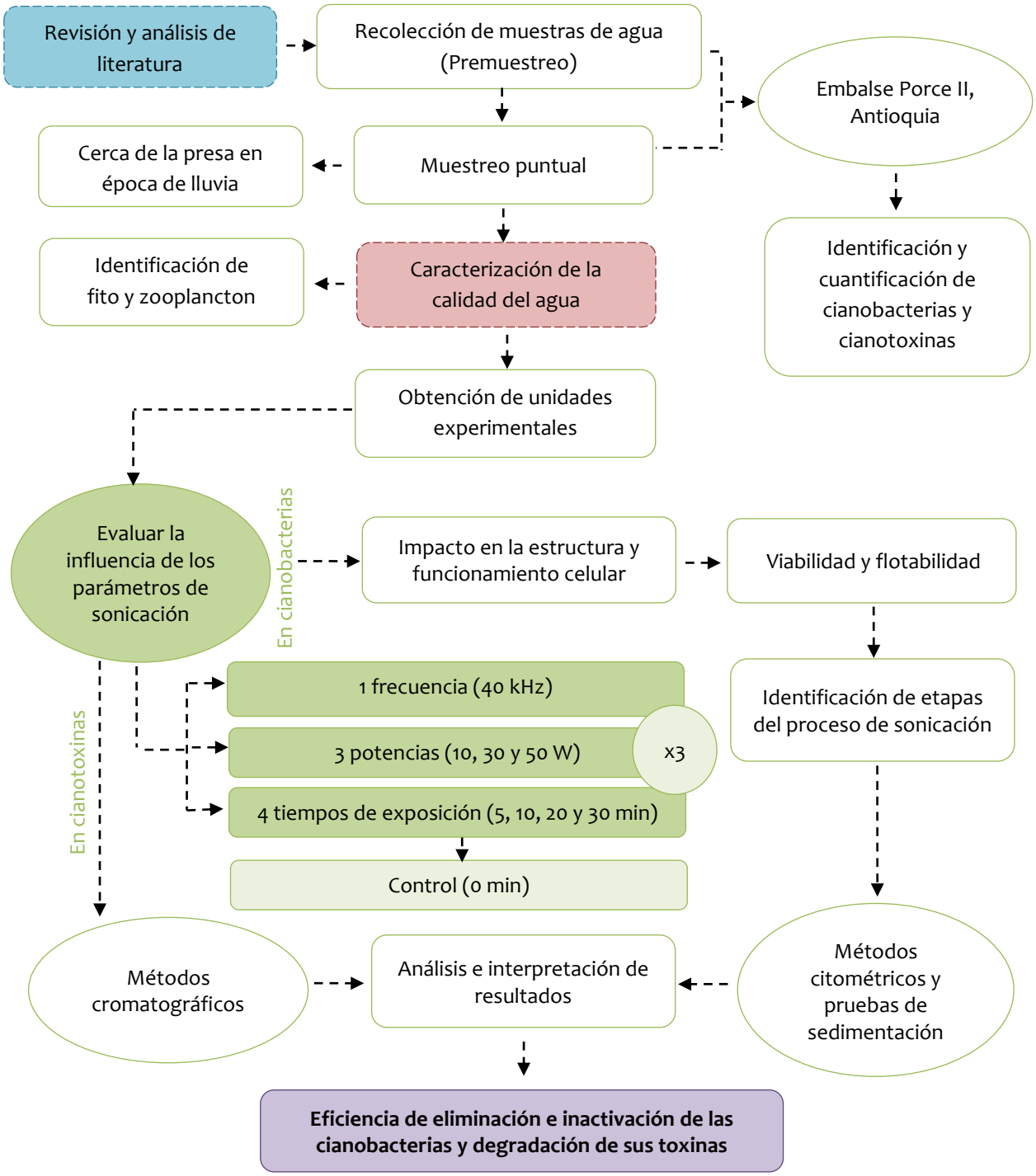


Figura 6. Desarrollo de actividades para alcanzar los objetivos planteados.

Se realizó una revisión y análisis constante de la literatura, por medio del acceso a los recursos de información digital y electrónica, del Sistema de Bibliotecas de la Universidad de Antioquia, lo que permitió la consulta de material en línea como documentos de producción científica y académica, disponibles en las diferentes bases de datos; siendo empleadas principalmente fuentes procedentes de Scopus, Springer, ACS y ScienceDirect. Más adelante, en los capítulos 1, 2 y 3, se detalla la metodología empleada para el desarrollo de cada objetivo específico.

4.1. Zona de estudio

En cuanto a la obtención de las unidades experimentales, que en este caso serían las muestras de agua con presencia de cianobacterias y sus toxinas, se llevó a cabo la recolección de muestras de agua natural provenientes del embalse Porce II (6° 48’ 38,7’’ N - 75° 8’ 46,3’’ W), un reservorio eutrofizado de la región ubicado al nordeste de Antioquia en Colombia (ver Figura 7), el cual según se ha evidenciado permanece con floraciones algales.



Figura 7. Recorrido del río Porce y ubicación conjunta de los embalses Porce II y III.

4.2. Recolección de muestras

De forma preliminar y en cooperación con el Grupo de Investigación en Gestión y Modelación Ambiental (GAIA), de la Facultad de Ingeniería, se obtuvo una muestra de agua proveniente del embalse Porce II, el 26 de noviembre de 2021 (ver Figura 8) durante una de sus campañas de muestreo periódicas. Lo anterior, con el fin de identificar la presencia de cianobacterias en las muestras de agua recolectadas y confirmar la presencia de la especie cianobacteriana de interés, la *Microcystis aeruginosa*, y como metabolito tóxico, la cianotoxina MC-LR, debido a que ambas han sido ampliamente estudiadas al ser bastante comunes en los cuerpos de agua.

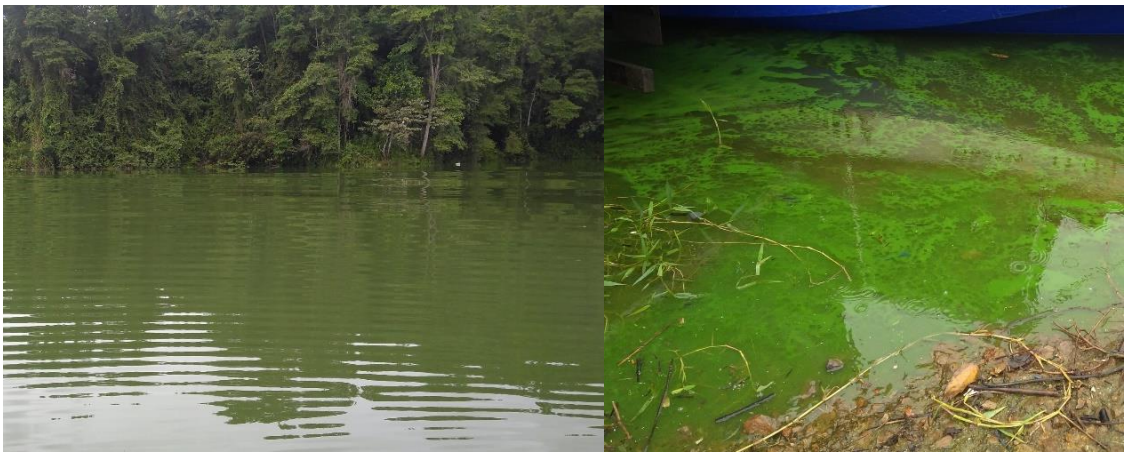


Figura 8. Aspecto del embalse Porce II durante el premuestreo 26-11-2021.

Con la autorización de EPM se ingresó el 2 de septiembre de 2022 al embalse Porce II, donde a pesar de la prolongada época de lluvia, se encontró afloramiento de cianobacterias cerca de la presa, sobre el margen derecho (6° 48’ 30,6’’ N - 75° 8’ 43,2’’ W - 942,7 msnm), con el nivel normal de operación (ver Figura 9). Se accedió al punto en lancha, de donde se recolectó 40 L en total de muestra natural en 4 recipientes plásticos ámbar de 10 L, cantidad suficiente para realizar los ensayos de sonicación y garantizar una reserva. Adicionalmente, se tomaron las respectivas muestras para los análisis de calidad del agua y su debida preservación. Para las cianotoxinas, se adicionó a los recipientes de muestreo reactivos de conservación, empleando trizma como tampón (pH 7), 2-cloroacetamida un antimicrobiano y ácido etilendiaminotetraacético para inhibir la unión de los analitos a los metales (EPA/600/R-17/344).



Figura 9. Nivel del agua en la presa, al momento del muestreo en el embalse Porce II.

La información de campo y demás datos referentes al plan de muestreo se encuentran registrados en los Anexos 1, 2 y 3. En la Figura 10, se muestra el sitio de muestreo y sus coordenadas. Adicionalmente, en la Figura 11 se observa su ubicación espacial por medio de una vista satelital.

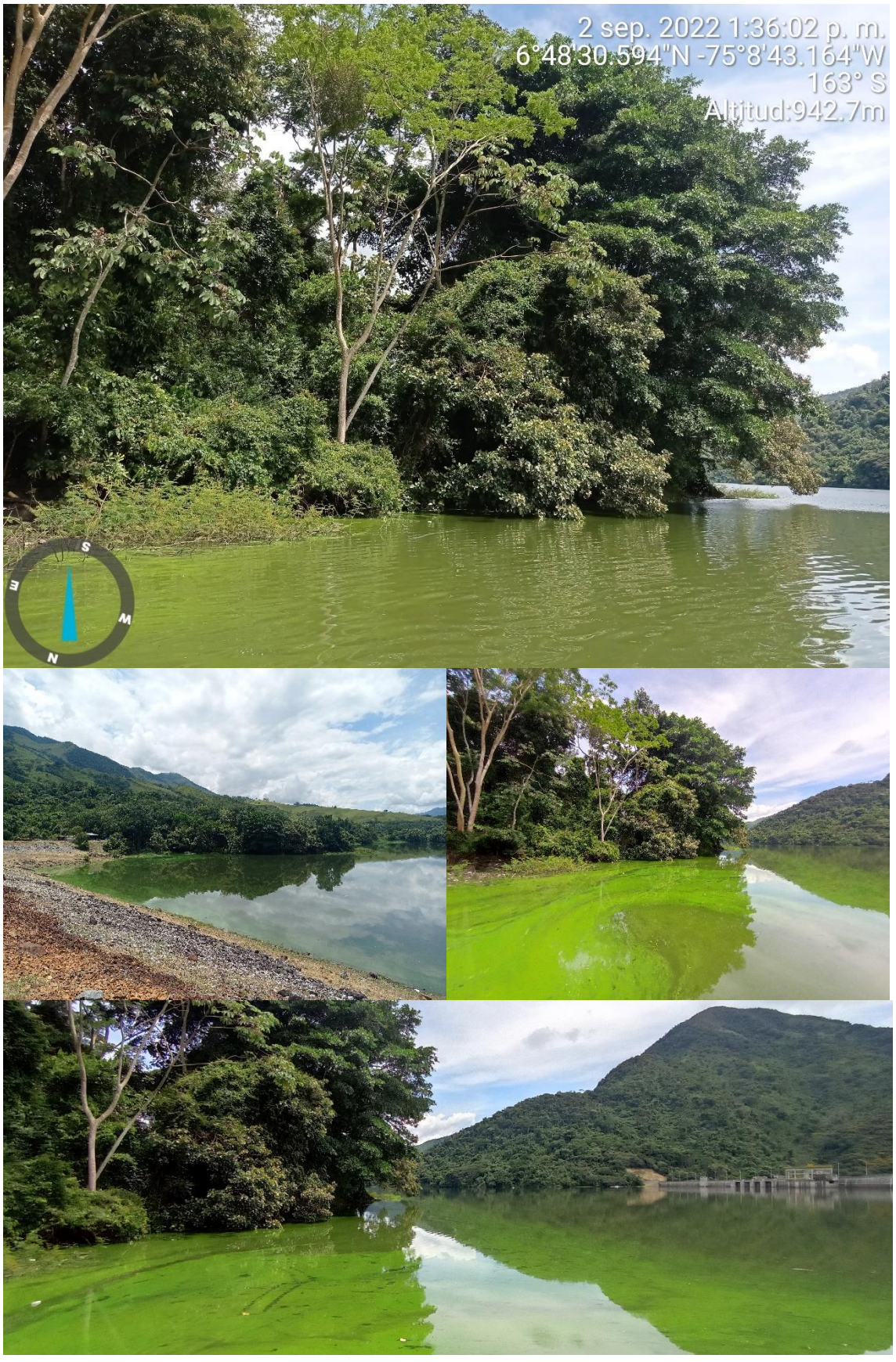


Figura 10. Sitio de muestreo con afloramiento de cianobacterias 02-09-2022.



Figura 11. Ubicación espacial del sitio de muestreo, represa embalse Porce II, sector el Mango (6° 48’ 30,6’’ N - 75° 8’ 43,2’’ W - 942,7 msnm).

4.3. Ensayos sonoquímicos

La eliminación o inactivación de las cianobacterias, por medio del impacto en la estructura y viabilidad de las células, y la degradación de sus toxinas, se llevó a cabo empleando un equipo de ultrasonido de baja frecuencia (Meinhardt, Alemania) (ver Figura 12), el cual permite operar a 5 potencias diferentes (10, 20, 30, 40 y 50 W). El reactor cuenta con un vaso de vidrio cilíndrico con una capacidad de 500 mL, el cual se encuentra acoplado a un transductor que genera ondas de ultrasonido a una frecuencia fija de 40 kHz. Durante la experimentación se utilizó la capacidad completa del reactor. Se evaluó la potencia real disipada en la solución mediante el método calorimétrico. Aproximadamente el 10% de la potencia efectuada se pierde mayormente en forma de calor (Parra-Enciso et al., 2022). Para su control, el vaso del reactor cuenta con una recirculación de agua que mitiga el incremento de la temperatura de la solución o agua a tratar, la cual se mantuvo alrededor de 27 ±3 °C, con una temperatura de refrigeración de 21 ±1 °C.



Figura 12. Equipo de ultrasonido de baja frecuencia.

4.4. Diseño experimental

Se obtuvo un total de 15 muestras incluyendo los controles para cada ensayo, tal como se indica en la Figura 13. Todos los ensayos se realizaron en la matriz de agua natural. El tiempo total de reacción en cada ensayo fue de 30 min, tomándose una alícuota de 50 mL de muestra a intervalos de tiempo de 5, 10, 20 y 30 min. Se realizó un montaje independiente para la sonicación de las muestras con base en cada objetivo, inicialmente para determinar el efecto sobre las cianobacterias y, por último, sobre sus toxinas. Se determinó la densidad celular y la concentración de cianotoxinas al inicio y al final de cada tratamiento. Frente a la dificultad de trabajar con muestras naturales y lograr obtener unidades experimentales iguales, se realizó un control sin tratamiento (0 min), para cada ensayo, dado que la agitación no garantiza su homogeneidad. Es por esto que algunas de las diferencias que se aprecian entre una réplica y otra pueden deberse al contenido dispar de células de cianobacterias y/o cianotoxinas presentes en las muestras de agua natural, lo cual influye significativamente en la desviación estándar de los valores obtenidos tras los análisis. Adicionalmente, cabe destacar que cada tratamiento se llevó a cabo por triplicado.

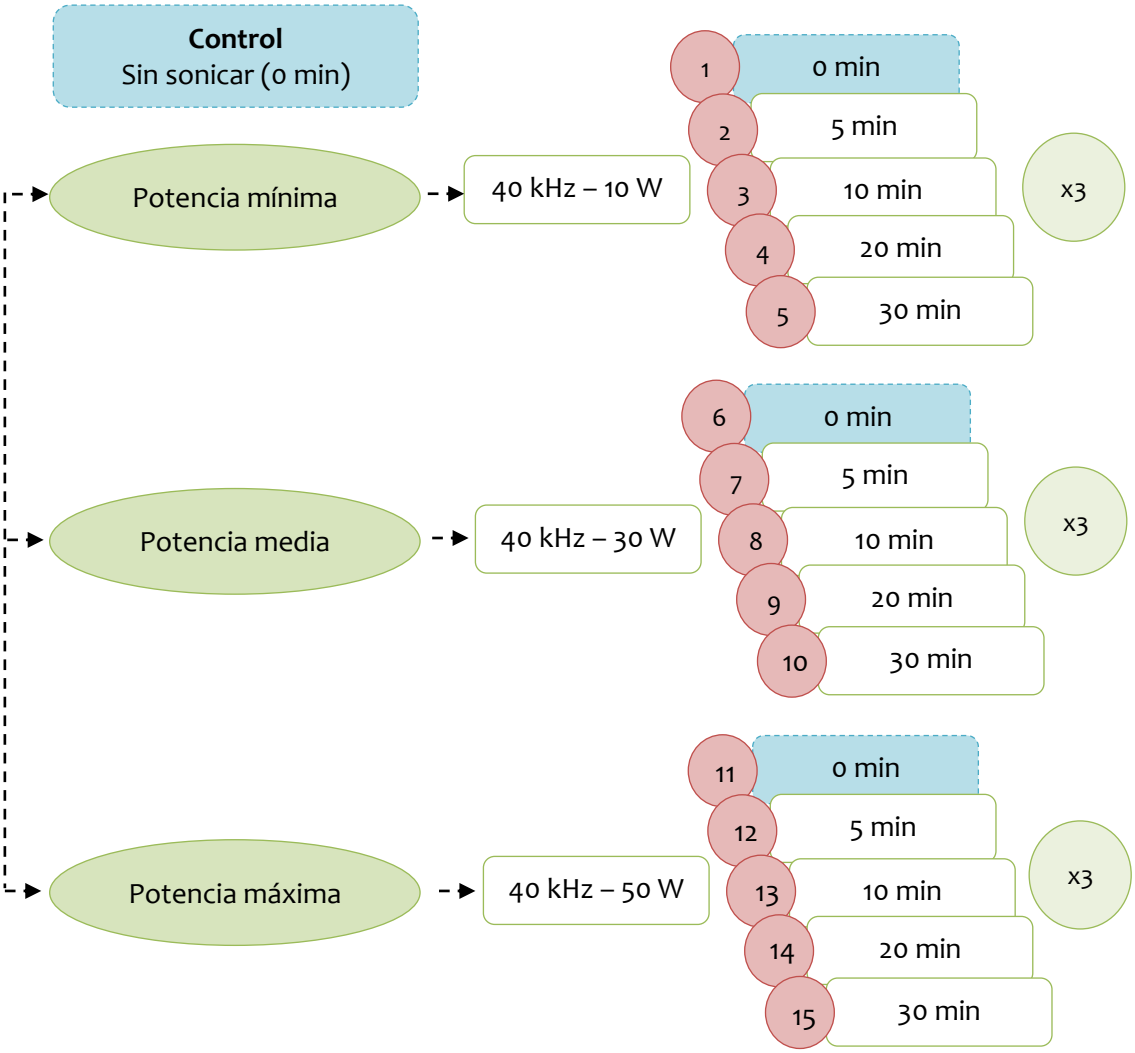


Figura 13. Diseño experimental para los ensayos de eliminación e inactivación de cianobacterias y degradación de cianotoxinas.

De este modo, se buscó identificar las diferentes etapas mencionadas en la Figura 3, sometiendo la matriz natural a 3 diferentes ensayos sonoquímicos. A una frecuencia fija de 40 kHz, se fue incrementando la potencia y tiempo de exposición, obteniendo muestras bajo una potencia mínima, media y máxima de 10, 30 y 50 W, y en los tiempos de exposición establecidos.

5. CAPÍTULO 1: CARACTERIZACIÓN DEL CUERPO DE AGUA

5.1. INTRODUCCIÓN

El río Porce es la principal fuente de alimentación de varias centrales hidroeléctricas de Antioquia; alimenta las centrales Porce II, Porce III, y Porce IV cuyo proyecto continúa suspendido indefinidamente por EPM a causa de problemáticas sociales. Nace de la confluencia de dos importantes ríos: el río Medellín y el río Grande, entre los municipios de Don Matías, Santa Rosa de Osos y Santo Domingo. El embalse Porce II se encuentra ubicado entre las poblaciones de Amalfi y Anorí; cuenta con una capacidad total de 142,7 millones de m^3, el cual inunda un área de 890 hectáreas, con el nivel normal de operación. La central se aprovecha de un caudal medio de 113,6 m^3/s; posee un salto bruto de 239,7 m, y genera al año 1.295 GWh/año (EPM, 2023).

Los programas tradicionales de monitoreo de cianobacterias y sus toxinas se basan en la recolección de muestras puntuales en tiempos específicos; donde influye significativamente la estrategia de muestreo, condicionada por la selección adecuada tanto espacial como temporal del o los puntos de muestreo (Pobel et al., 2011). Las muestras de agua superficial se recolectan comúnmente de forma manual. Para ello, es recomendable utilizar recipientes de vidrio ámbar con el fin de evitar posibles adsorciones del analito de interés en las paredes del recipiente (Kamp et al., 2016) y minimizar la exposición de la muestra de agua a la radiación solar (Kurtz et al., 2021) para evitar la aparición de reacciones fotoquímicas, como la fotólisis, que pudieran alterar las condiciones fisicoquímicas de la muestra. De esta manera, una adecuada recolección, preservación y almacenamiento de las muestras es primordial, garantizando la veracidad en los análisis. Asimismo, el tiempo de almacenamiento no debe superar los 6 meses (ICONTEC, 2018).

La determinación de fitoplancton y zooplancton, es una forma de establecer el nivel de eutrofización del agua (García-Chicote, 2015; Wang et al., 2021). El aporte de nutrientes en los ecosistemas acuáticos, principalmente fósforo (P) y nitrógeno (N) favorece la eutrofización de los embalses, lo que resulta en el deterioro de la calidad del agua y la presencia de las floraciones de cianobacterias tóxicas (Wang et al., 2018). En este sentido, existen índices de estructura de comunidades cuya premisa se basa en que la contaminación acuática afecta la diversidad de especies y por ende simplifica el ecosistema (Simões et al., 2015). Así mismo, la presencia de florecimientos de cianobacterias afecta la biodiversidad del plancton y la eficiencia en el uso de los recursos (Zhao et al., 2022).

Es necesario entonces, llevar a cabo muestreos representativos que permitan conocer el estado o nivel de afectación del cuerpo de agua, para lo cual, se ha elaborado diversos protocolos y técnicas de muestreo, que guían el proceso de recolección, preservación, transporte y almacenamiento de las muestras. En general, las muestras de agua superficial se recolectan entre 0,3 y 1 m de profundidad, mientras que las muestras de plancton se toman de la superficie utilizando redes cónicas (ICONTEC, 2016, 2020). Para la identificación de fito y zooplancton, el muestreo puede ser de tipo cuantitativo o cualitativo. En el primer caso la muestra no debe ser filtrada, puesto que se pretende expresar la densidad o número de individuos por mililitro, llevando a cabo la recolección de un volumen de agua aproximado de 250 mL, al que se le adiciona un preservante (ICONTEC, 2018). Para las muestras cualitativas se lleva a cabo un registro de los morfotipos presentes en el cuerpo de agua; así, los organismos en este caso solo se reportan como presencia/ausencia, y se permite identificar, por ejemplo, la presencia de organismos

potencialmente tóxicos (IDEAM & INVEMAR, 2017). En este sentido, un adecuado desarrollo del plan de muestreo, permitirá la caracterización del cuerpo de agua, a través de la obtención de parámetros de calidad, índices y bioindicadores.

5.2. METODOLOGÍA

Junto con la recolección de las muestras de agua natural se realizaron mediciones *in situ* de temperatura del agua, pH, ORP, oxígeno disuelto y turbiedad, a través de equipos multiparamétricos descritos en la captura de datos de campo (ver Anexo 1). Así mismo, se determinó la transparencia y los sólidos sedimentables por medio de un disco Secchi y un cono Imhoff, respectivamente. De igual manera, se analizaron en el laboratorio algunas variables fisicoquímicas como color aparente, conductividad, ortofosfatos, fósforo total, alcalinidad total, dureza total, nitrógeno amoniacal, nitrógeno total Kjeldahl, nitratos, nitritos, carbono orgánico total (COT), y microbiológicas como heterótrofos/mesófilos, *Escherichia coli* y coliformes totales, con el fin de caracterizar la matriz. En la Figura 14, se aprecia el aspecto turbio del río Porce y el gran aporte de sólidos suspendidos en su llegada al embalse Porce III.



Figura 14. Llegada del río Porce al embalse Porce III.

Mediante muestreo puntual y evitando disipar el afloramiento algal, se tomaron dos tipos de muestras, una superficial de la zona fótica (ZF) y otra integrada hasta el límite de la zona fótica (LZF), con la ayuda de una botella Kemmerer (ver Figura 15). Margalef (2002) define el LZF como la profundidad en la cual la intensidad de la luz queda reducida a un 1% de la que ha penetrado en la superficie; constituyendo un límite por debajo del cual no queda lugar para los procesos de fotosíntesis. En este caso, con una transparencia del agua de 1,43 m, se calculó el LZF hasta 3,86 m de profundidad, sin embargo, la profundidad máxima en el punto de muestreo no superó los 3,10 m, por lo que la muestra integrada representó toda la columna de agua.



Figura 15. Procedimiento de recolección de muestras y análisis *in situ*.

Para el análisis cuantitativo de la comunidad fito y zooplanctónica se tomaron dos muestras de agua, de 500 mL cada una, mediante arrastres superficiales horizontales (ver Figura 16), con redes de plancton de 25 y 45 µm de diámetro de poro, respectivamente, durante 30 s, a una velocidad de 3 m/s aproximadamente. El material colectado se fijó *in situ* con lugol y alcohol al 70%, respectivamente, y se refrigeró a una temperatura entre 0-6 °C hasta llevar a cabo los análisis respectivos al microscopio.



Figura 16. Uso de red cónica para el muestreo de fitoplancton y zooplancton.

Inicialmente, se realizó una visualización de la muestra antes de iniciar el recuento, con la finalidad de elaborar una lista de las taxas presentes en la muestra y tener una idea general de la densidad de organismos. Para la identificación taxonómica de las comunidades planctónicas, se emplearon las claves de Komárek & Anagnostidis (1989), Komárek & Anagnostidis (1999) y Hoffmann et al. (2005) en la determinación del fitoplancton, y las claves de kosté (1978) y Paggi (1995) además de las investigaciones de Gallo et al., (2009) y Villabona et al., (2010) en la determinación del zooplancton. Las imágenes se obtuvieron haciendo uso del programa B-View (Boeco, Alemania) por medio de la conexión USB de una cámara Boeco B-CAM de 16MP incorporada al microscopio (ver Figura 17).

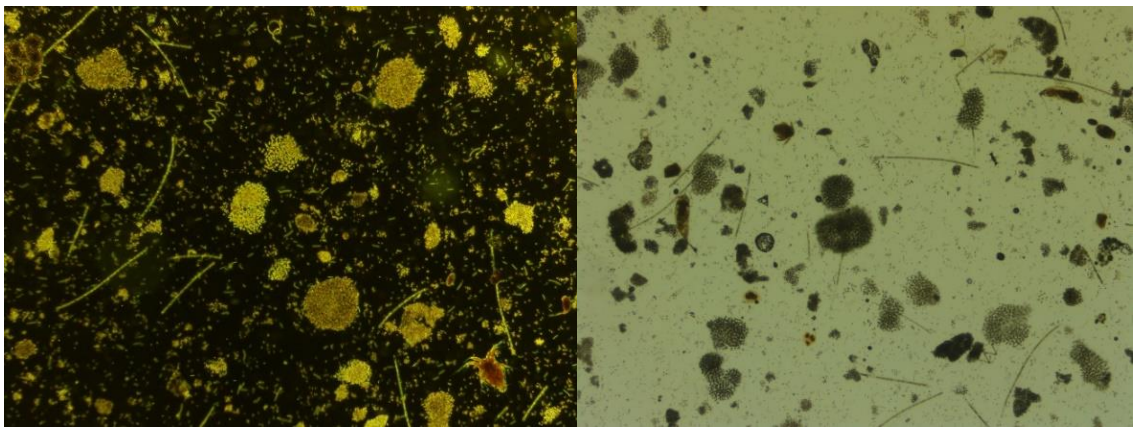


Figura 17. Comunidad planctónica observada en el microscopio a 40X.

Para el recuento, se utilizó una cámara de Sedgwick-Rafter, cuyas dimensiones son de 5 cm de largo por 2 cm de ancho y 1 mm de altura, con capacidad para 1 mL de muestra. Para el análisis

de las muestras, se utilizó un microscopio invertido modelo BIB-100 (Boeco, Germany) (ver Figura 18). Las observaciones al microscopio, se efectuaron según Ros (1979), por medio de un recuento en 30 campos de observación seleccionados aleatoriamente, controlando la estabilidad de conteo, a través de la curva de rarefacción. El conteo se efectuó con una magnificación total de 400X para fitoplancton incluido protozoos y de 40X para zooplancton. La densidad de organismos se determinó empleando la Ecuación (1) propuesta por Ros (1979).

$$\frac{\#indiv}{mL} = \frac{N \times F}{S \times C \times h} = \frac{N \times \frac{10^3 mm^3}{1mL}}{área \times 30 \times 1mm} \quad (1)$$

Donde:
N= número total de individuos
F= factor de conversión
S= superficie (área) en mm^2 del campo del microscopio
C= número de campos contados
h= altura entre el cubre y el portaobjetos



Figura 18. Microscopio invertido Boeco y cámara de Sedgwick-Rafter.

Finalmente, se determinaron los índices de estructura de comunidades tales como diversidad (H), dominancia (D) y equidad (J), por medio de las Ecuaciones (2), (3) y (4) según lo propuesto por Shannon-Weaver (1949), Simpson (1949) y Pielou (1966), respectivamente. La riqueza (R) se expresa simplemente como el número total de taxas.

$$H = -\sum \frac{(n_i)}{(N)} \ln \frac{(n_i)}{(N)} \quad (2)$$

Donde:
H= índice de diversidad de Shannon-Weaver
n_i= número de individuos de cada taxa
N= número total de individuos
ln= logaritmo natural

Valores de H entre 0 y 1 indican ambientes muy contaminados, entre 1 y 3 corresponden a aguas de moderada contaminación y de 3 en adelante aguas de buena calidad.

$$D = \frac{\sum n_i(n_i - 1)}{N(N-1)} \quad (3)$$

Donde:
D= índice de dominancia de Simpson
n_i= número de individuos de cada taxa
N= número total de individuos

Los valores de D varían entre 0 y 1, donde el valor de 0 representa la mínima dominancia y 1 la máxima.

$$J = \frac{H}{H_{max}} \quad (4)$$

Donde:
H= índice de diversidad de Shannon-Weaver
H_{max}= máximo valor de H ($\ln R$)

Los valores de J varían entre 0 y 1, donde el valor de 0 representa la mínima equidad y 1 la máxima.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Parámetros de calidad del agua

En la Tabla 1, se presentan las variables fisicoquímicas medidas *in situ* y los análisis realizados en el laboratorio del Grupo GDCON, de las muestras de agua superficial provenientes del embalse Porce II, Antioquia. El análisis y reporte de resultados se da conforme a los protocolos internos del sistema de calidad. El laboratorio se encuentra acreditado según la Resolución 2791 del 6 de diciembre de 2022 por el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM) y el Organismo Nacional de Acreditación de Colombia (ONAC).

Tabla 1. *Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de las muestras de agua superficial provenientes del embalse Porce II, Antioquia.*

Análisis	Muestra		Unidades
	ZF	LZF	
Temperatura	30,2	25,8	°C
pH	7,06	6,90	Unidades de pH
ORP	234	270	mV
Oxígeno disuelto	7,53	6,58	mg O_2/L
Solidos sedimentables	0	0	mL/L
Turbiedad	23,57	5,87	NTU
Color aparente	98,30	88,79	UC

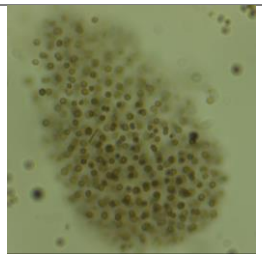
Conductividad	139,9	169,9	µs/cm
Ortofosfatos	<0,06	0,10	mg PO_4^{3-}/L
Fósforo total	0,94	0,51	mg P/L
Alcalinidad total	31,90	32,61	mg $CaCO_3$/L
Dureza total	32,0	30,8	mg $CaCO_3$/L
Nitrógeno amoniacal	0,67	1,80	mg NH_3-N/L
Nitrógeno total Kjeldahl	1,18	2,55	mg N/L
Nitratos	2,928	2,445	mg NO_3/L
Nitritos	0,190	0,195	mg NO_2^-/L
COT	3,440	3,758	mg C/L
Heterótrofos/mesófilos	DNPC	DNPC	UFC/g
Escherichia coli	41,0	52,0	NMP/100mL
Coliformes totales	111.900	24.196	NMP/100mL

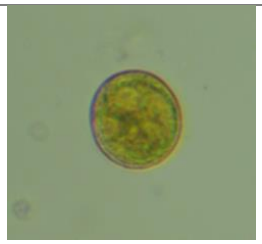
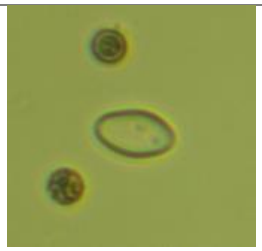
Nota. DNPC: demasiado numerosas para contar; UFC: unidad formadora de colonias; NMP: número más probable.

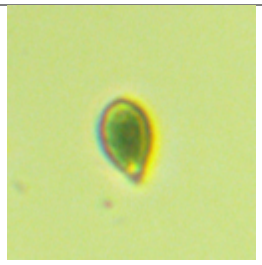
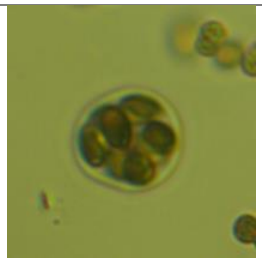
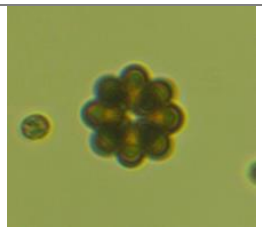
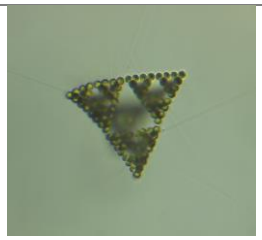
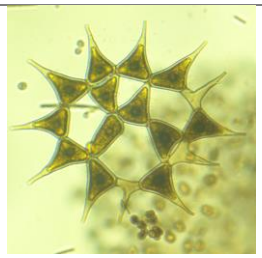
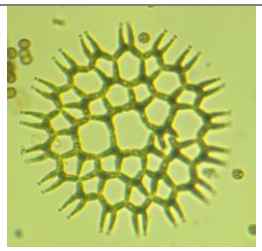
5.3.2. Identificación de fitoplancton y zooplancton

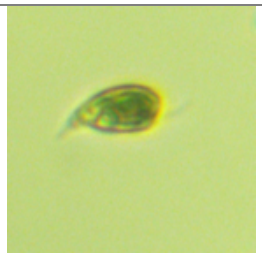
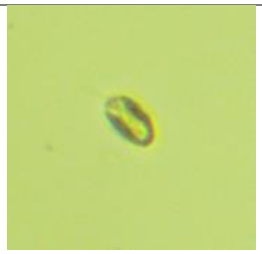
En las Tablas 2 y 3 se indica la densidad de organismos presentes en el agua para cada una de las especies identificadas. Los resultados se dan en número de individuos/mL. Adicionalmente, se nombran de forma descendente de acuerdo a su recurrencia en el recuento. Así, expresado en porcentaje, se ve una clara dominancia de la especie *Microcystis* spp.

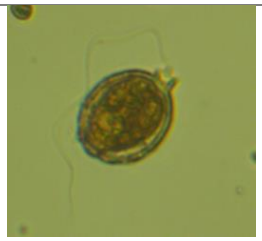
Tabla 2. *Fitoplancton presente en el embalse Porce II, Antioquia.*

#	Foto	Género/Especie	División taxonómica	Indiv/mL	%
1		*Microcystis* spp.	Cyanobacteria	2,47E+06	94,44
2		*Pseudanabaena* sp.	Cyanobacteria	1,18E+05	4,52

3		*Navicula* sp.	Ochrophyta	9,85E+03	0,38
4		*Aulacoseira granulata*	Ochrophyta	4,41E+03	0,17
5		*Aulacoseira spiroides*	Ochrophyta	1,36E+03	0,05
6		*Mallomonas* sp.	Ochrophyta	1,19E+03	0,05
7		*Cyclotella* sp.	Ochrophyta	1,70E+02	0,01
8		*Tabellaria* sp.	Ochrophyta	1,70E+02	0,01
9		*Cocconeis* sp.	Ochrophyta	1,70E+02	0,01

10		*Pandorina* sp.	Chlorophyta	2,72E+03	0,10
11		*Chlamydomonas* sp.	Chlorophyta	1,53E+03	0,06
12		*Oocystis* sp.	Chlorophyta	1,02E+03	0,04
13		*Coelastrum* sp.	Chlorophyta	1,70E+02	0,01
14		*Micractinium* sp.	Chlorophyta	1,70E+02	0,01
15		*Pediastrum simplex*	Chlorophyta	1,70E+02	0,01
16		*Pediastrum duplex*	Chlorophyta	1,70E+02	0,01

17		*Staurastrum* sp.	Charophyta	1,02E+03	0,04
18		*Closterium* sp.	Charophyta	-	-
19		*Cryptomonas* sp1.	Cryptista	1,02E+03	0,04
20		*Cryptomonas* sp2.	Cryptista	3,40E+02	0,01
21		*Cryptophyta* sp.	Cryptista	1,70E+02	0,01
22		*Phacus* sp.	Euglenozoa	6,79E+02	0,03
23		*Trachelomonas* sp1.	Euglenozoa	5,09E+02	0,02

24		*Trachelomonas* sp2.	Euglenozoa	1,70E+02	0,01
25		*Ceratium* sp.	Dinoflagelado	1,70E+02	0,01
			Total	**2,62E+06**	**100%**

Según se evidenció, las especies con recuentos más altos dentro de la comunidad fitoplanctónica, pertenecen al filo de las Cianobacterias, representando un 98,96% del total de los organismos presentes en la muestra. Entre estas se identificó dos tipos de cianobacterias, *Microcystis* spp., unicelulares formadoras de colonias con recubrimiento mucilaginoso del orden chroococcales, con un 94,44%, y *Pseudanabaena* sp., filamentosas no heterocísticas del orden oscillatoriales, con un 4,52%. No obstante, se obtuvo una gran variedad de especies, aunque en menores proporciones. En cuanto a la *Microcystis* spp., se identificaron múltiples especies, al observar diferentes tamaños celulares (5-10 µm) y tipos de formación de colonias (ver Figura 19). Entre ellas, se encontró principalmente *Microcystis aureginosa* y *wesenbergii*, con un promedio de 156 células por colonia, y un recuento total de 93 colonias incluyendo las células dispersas; es decir, 1,59E+04 colonias/mL.

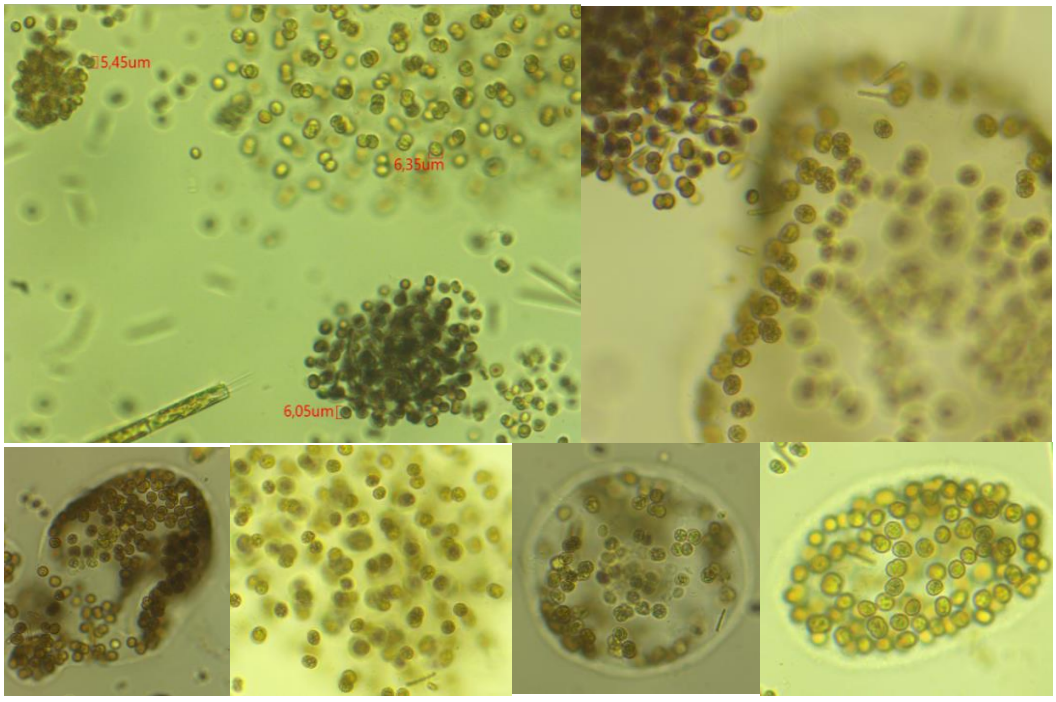
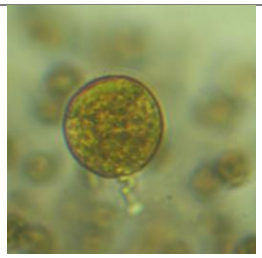
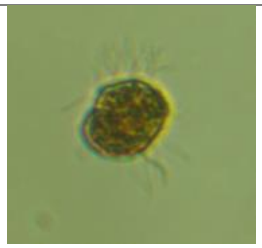
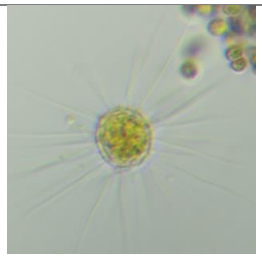
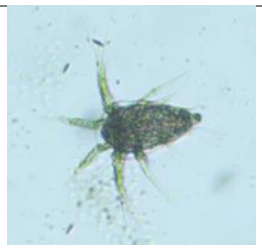
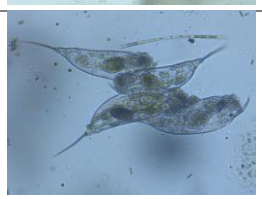


Figura 19. Visualización de diferentes tipos de colonias de *Microcystis* spp., en el embalse Porce II.

Tabla 3. *Zooplancton presente en el embalse Porce II, Antioquia.*

#	Foto	Género/Especie	Zooplancton	Indiv/mL	%
1		*Vorticella* sp.	Protozoos	5,09E+02	24,74
2		*Protozoo ciliado*	Protozoos	3,40E+02	16,50
3		*Protozoo peritrichia*	Protozoos	3,40E+02	16,50
4		*Actinophrys* sp.	Protozoos	1,70E+02	8,25
5		*Nauplio*	Copépodos	4,57E+02	22,22
6		*Copepodito*	Copépodos	7,01E+01	3,41
7		*Trichocerca* sp.	Rotíferos	5,89E+01	2,86

8		*Keratella quadrata*	Rotíferos	3,79E+01	1,84
9		*Keratella cochlearis*	Rotíferos	3,65E+01	1,77
10		*Polyarthra* sp.	Rotíferos	2,81E+01	1,36
11		*Brachionus* sp.	Rotíferos	5,61E+00	0,27
12		*Brachionus havanaensis*	Rotíferos	4,21E+00	0,20
13		*Bosmina longirostris*	Cladócero	1,40E+00	0,07
			Total	**2,06E+03**	**100%**

Dentro de la comunidad zooplanctónica, *Vorticella* sp., del filo Ciliophora, figuró como el género con mayor abundancia. En total, los protozoos representaron un 65,99% de los organismos presentes en el agua, seguido de copépodos con un 25,63%, en estado de nauplios, en su mayoría. Adicionalmente, se encontraron rotíferos en una proporción de 8,32%, pero con una mayor

cantidad de representantes, y por último, a pesar de tan notoria dominancia de los demás organismos de la muestra, se halló un cladócero o pulga de agua, *Bosmina longirostris*.

5.3.3. Índices de estructura de comunidades

En la Tabla 4, se presentan los valores de los principales índices de estructura de comunidades calculados por medio de las Ecuaciones (2), (3) y (4), conforme al recuento realizado para fito y zooplancton. Estos índices, se basan en la densidad de los organismos y en la determinación de cada taxa o morfotipo, y tienen en cuenta la estructura de la comunidad acuática en cuanto a su riqueza, equidad y abundancia.

Tabla 4. *Índices de estructura de comunidades del embalse Porce II, Antioquia.*

Índice	Diversidad	Dominancia	Equidad	Riqueza
Fitoplancton	0,26	0,89	0,08	25
Zooplancton	1,93	0,17	0,75	13

Con el fin de no subestimar la presencia de *Microcystis* spp. en la muestra, se realizó el cálculo de los índices teniendo en cuenta el recuento de células más no de colonias, puesto que el número de colonias, no refleja en absoluto el equivalente a número de células. Esto en el sentido de que se encontraron 93 colonias en total, con una variabilidad tan alta en cuanto a la cantidad de células, que iba desde un mínimo de 35 células hasta un máximo de 632 células.

5.4. DISCUSIÓN

Una de las especies de algas propensas a las floraciones es *Microcystis aeruginosa*, la cual abunda en aguas con un pH neutro o ligeramente alcalino (Peng et al., 2020). Además, las aguas del embalse presentan una alta presencia de O_2, y por ende de ORP, lo que favorece la proliferación de las cianobacterias. Así mismo, la presencia de floraciones en el agua, aunque permite el sostenimiento de los niveles de O_2, debido a la actividad fotosintética algal, también implica la formación de una nata verde superficial en conjunto con un aumento en la turbiedad, lo cual disminuye notablemente la transparencia del agua, impidiendo así que la luz penetre en la columna de agua y limitando el crecimiento de las demás especies. Según Chorus y Bartram (1999), las cianobacterias tienen una ventaja competitiva en aguas con alta turbidez manteniendo una tasa de crecimiento relativamente mayor que otros organismos del fitoplancton cuando las intensidades de luz son bajas, debido al reducido requerimiento de energía de estos organismos para mantener la función de las células y su estructura (Chorus & Bartram, 1999). Por otro lado, la temperatura promedio del agua se mantuvo por encima de 25 °C, óptima para lograr tasas de crecimiento máximo, y cuya incidencia del sol aumenta significativamente la temperatura superficial del agua. Adicionalmente, se observa que las características del agua superficial y del límite de la zona fótica son muy parecidas, y, por lo tanto, no existe impedimento para que las cianobacterias puedan desarrollarse dentro del rango de la zona fótica.

En consecuencia, el crecimiento masivo de algas y/o plantas acuáticas como respuesta al aporte de nutrientes al agua, las convierte en importantes bioindicadores de eutrofización. Adicionalmente, en la Tabla 5 según Vollenweider (1968), es posible obtener un diagnóstico del estado de eutrofización de un cuerpo de agua, con base en la concentración de las tres especies

químicas del N, en contraste a las concentraciones de P, que regula el crecimiento de la biomasa dada su baja disponibilidad.

Tabla 5. *Estado trófico en relación a las concentraciones de nitrógeno y fósforo en el agua.*

Estado trófico	Amonio (mg NH_4/L)	Nitratos (mg NO_3/L)	Nitritos (mg NO_2^-/L)	Fósforo total (µg P/L)
Oligotrófico	0,0-0,3	0,0-1,0	0,0-0,5	5,0-10,0
Mesotrófico	0,3-2,0	1,0-5,0	0,5-5,0	10,0-30,0
Eutrófico	2,0-15,0	5,0-50,0	5,0-15,0	30,0-100,0

En cuanto a las concentraciones de N y P, se tiene que la proporción óptima para las cianobacterias se encuentra entre 10-16N:1P (Chorus & Bartram, 1999). Para Porce II, la proporción entre el N total Kjeldahl (NTK) y el P total es de aproximadamente 1,2N:1P, por lo tanto, el P no es limitante en el agua. En el embalse, el contenido de P total fue de 94 µg/L, por lo que el cuerpo léntico se encuentra en un nivel de productividad eutrófico, aunque en referencia a las concentraciones de N no supera el umbral mesotrófico; pero, precisamente, cuando los cuerpos de agua dulce se enriquecen en nutrientes, especialmente con P, a menudo hay un cambio en la comunidad fitoplanctónica hacia la dominancia por las cianobacterias (O'Neil et al., 2012; Yan et al., 2017). Por sí mismo, el fitoplancton no suele perdurar más que unos días, pero al formar floraciones pueden durar semanas.

Davis et al. (2010), por su parte, evaluaron cómo varias fuentes de N y P afectan el crecimiento de cepas tóxicas y no tóxicas de *Microcystis* spp. durante floraciones naturales. Los resultados obtenidos sugieren que las cepas tóxicas pueden tener una mayor demanda de ambos nutrientes. Además, la abundancia de cepas tóxicas aumenta con N inorgánico más que con N orgánico, mientras que las cepas no tóxicas son estimuladas por N orgánico más que con N inorgánico. Por otro lado, el P inorgánico aumenta la abundancia de cepas tóxicas más que las no tóxicas. Por lo tanto, concentraciones más altas de N y/o P inorgánicos probablemente promuevan floraciones dominadas por cepas tóxicas y potencialmente produzcan concentraciones más altas de microcistinas en el ambiente (Davis et al., 2010). En consecuencia, las altas concentraciones de especies inorgánicas de N y P, en el embalse Porce II, podría haber favorecido la presencia de cepas toxicas en el agua. No obstante, nuevos hallazgos destacan la evidencia de que algunas floraciones no diazotróficas de cianobacterias como *Microcystis* spp., poseen adaptaciones fisiológicas que les permiten dominar las aguas superficiales incluso con bajo contenido de P, y su crecimiento estará dado mediante la disponibilidad de N (Gobler et al., 2016). Sin embargo, estudios recientes muestran que por medio de un control a largo plazo de la carga de P en reservorios eutróficos con floraciones persistentes de cianobacterias, es posible acelerar los procesos de restauración y la recuperación de sus comunidades acuáticas, al reducir significativamente la dominancia de cianobacterias (Barçante et al., 2020). De este modo, sería posible dar lugar a una comunidad fitoplanctónica mucho más diversa en el embalse, si se lograra una reducción de la carga contaminante. Si bien, se debe en cuenta que las floraciones pueden llegar a restablecerse al interrumpir dichas intervenciones.

Teniendo en cuenta que en Colombia no existe legislación que regule el contenido de cianobacterias ni sus toxinas en los cuerpos de agua, EPM ha incorporado un sistema de semáforo que incluye los colores verde para densidades menores a 2,00E+04 cel/mL (valores bajos),

amarillo entre 2,00E+04 y 1,00E+05 cel/mL (efectos leves) y rojo mayores a 1,00E+05 cel/mL (alto riesgo), con el fin de controlar y mitigar los efectos asociados a la proliferación de cianobacterias (González Hernández, 2021). Sin embargo, se señala la importancia de ahondar en estrategias de prevención no solo para embalses destinados al consumo humano, puesto que se alcanzaron niveles de alto riesgo para el embalse Porce II con 2,47E+06 cel/mL, y aunque su propósito es la generación de energía, ha superado alarmantemente el umbral establecido.

Adicionalmente, la abundancia de *Vorticella* sp. en el embalse Porce II es otro indicativo más de su mal estado (Aguirre Ramírez & Caicedo Quintero, 2013). Estos protozoos son microorganismos ciliados de agua dulce eutrofizada, los cuales se fijan al sustrato por medio de un pedúnculo contráctil; de esta forma, se observó al microscopio a varios ejemplares adheridos a las colonias de *Microcystis* spp., formando una corriente de agua que arrastra las células para alimentarse de estas. Por otro lado, el género *Vorticella* sp. es común en aguas con una carga orgánica media y un tiempo de residencia bajo (Patterson, 1998), por lo que se asocia con ambientes meso y polisaprobios; es decir, a aguas muy contaminados y con alto contenido de materia orgánica. En este sentido, la acumulación y persistencia de las cianotoxinas puede darse por medio del material tóxico presente en sedimentos (Maghsoudi et al., 2015). De hecho, se ha reportado que las toxinas retenidas en las células intactas en el sedimento pueden persistir por varios meses (Bláha et al., 2009); así mismo, estas células fácilmente pueden sufrir lisis por acción de otras bacterias y protozoos, liberando rápidamente las toxinas al medio (Santos et al., 2020).

Por otro lado, debe resaltarse la presencia de todas las especies zooplanctónicas halladas en el cuerpo de agua, a pesar de las elevadas concentraciones de cianotoxinas que fueron cuantificadas en el embalse. Este hecho abre un campo de estudio acerca de su resistencia a altos niveles de toxicidad en el agua. Simões et al. (2015) sugiere que los embalses comparten especies en común, más que los reservorios naturales, ya que son especies que tienen mayor tolerancia al cambio ambiental; si bien, es posible identificar una mayor cantidad de especies en reservorios naturales que en embalses (Simões et al., 2015). Según García-Chicote (2015), los embalses más eutróficos comparten especies características y diferentes al resto, como el copépodo *Acanthocyclops americanus*, los cladóceros *Moina micrura* y *Bosmina longirostris* y los rotíferos *Brachionus calyciflorus*, *B. angularis*, *Polyarthra vulgaris-dolichoptera*, *Keratella cochlearis*, *K. tropica* y *Pompholyx sulcata* (García-Chicote, 2015). Algunas de estas especies fueron halladas en el embalse Porce II (ver Tabla 3). A propósito, es destacable la relación de la composición del zooplancton con la eutrofia; un claro ejemplo, es la presencia de *Bosmina longirostris* en la muestra de agua, los cuales son crustáceos branquiópodos asociados con ambientes acuáticos contaminados, a diferencia de la *Dhapnia* spp., especie empleada como bioindicador de calidad del medio acuático. En el mismo sentido, se destaca la eutrofia como el factor estructurador más potente. Una mayor concentración de nutrientes y una mayor producción primaria suponen mayor abundancia de zooplancton, pero también una menor riqueza, un inequitativo reparto de abundancia entre las especies y, por ende, una menor diversidad (Barnett & Beisner, 2007).

De manera que, es evidente que estas aguas son altamente contaminadas, más aún, al traer los vertimientos del área metropolitana del Valle de Aburra. De hecho, los valores obtenidos de los índices de estructura de comunidades, indican consecuentemente que el embalse Porce II es un ambiente contaminado, con una alta dominancia de *Microcystis* spp. y, por ende, posee una baja diversidad de especies. En cuanto a los valores obtenidos de diversidad fitoplanctónica, el embalse proporciona un ambiente muy contaminado; sin embargo, con base en la comunidad zooplanctónica, dado que no se tuvo abundancias tan pronunciadas como para las microalgas,

señala una contaminación moderada/alta (Aguirre Ramírez, 2013). Ambos panoramas advierten un efecto no deseable en la conservación de la calidad del agua del embalse y la necesidad de un seguimiento, en particular de su estado trófico.

En efecto, a medida que la dominancia se incrementa, la diversidad disminuye. Dado que se obtuvieron valores de dominancia bastante altos, para el fitoplancton en comparación con el zooplancton, es de esperarse una diversidad mucho más baja. Siendo las cianobacterias la especie dominante en el embalse Porce II. Por otro lado, y evidentemente, se obtuvo una mínima equidad para la comunidad fitoplanctónica, al tener un 98,96% representado en 2 especies cianobacterianas, de un total de 25 algas. En cuanto al zooplancton se tuvo una comunidad mucho más equitativa. Finalmente, en referencia a los morfotipos encontrados en la muestra, se tiene 38 especies en total, 25 ejemplares de fitoplancton y 13 ejemplares de zooplancton. Una riqueza relativamente alta pese a la contaminación del agua, la abundancia de cianobacterias, y teniendo en cuenta, además, la producción de toxinas en altas concentraciones (Zhao et al., 2022). De este modo, el impacto de las cianobacterias en las comunidades planctónicas proporciona una base de conocimiento para gestionar la calidad del agua del embalse y el funcionamiento del ecosistema.

5.5. CONCLUSIONES

En el embalse Porce II, el contenido de N y P señalaron que se trata de un cuerpo de agua eutrofizado, lo que implica un cambio en la comunidad fitoplanctónica hacia la dominancia de las cianobacterias. De hecho, la *Microcystis* spp. representó un 94,44% de la comunidad fitoplanctónica con 2,47E+06 cel/mL, y la *Pseudanabaena* sp. otro 4,52%. No obstante, se obtuvo una gran variedad de especies, aunque en menores proporciones.

Dentro de la comunidad zooplanctónica, los protozoos representaron un 65,99% del total de organismos presentes en el agua, seguido de copépodos con un 25,63% y rotíferos con un 8,32%, pero con una mayor cantidad de representantes. Se halló también un cladócero o pulga de agua, *Bosmina longirostris*, cuya presencia es común en ambientes acuáticos contaminados, además de otras especies características como *Polyarthra vulgaris* y *Keratella cochlearis*.

Se destaca la presencia de todas las especies zooplanctónicas halladas en el cuerpo de agua, a pesar de las elevadas concentraciones de cianotoxinas que fueron cuantificadas en el embalse. Este hecho abre un campo de estudio acerca de su resistencia a altos niveles de toxicidad en el agua. Adicionalmente, la abundancia de *Vorticella* sp. indica un alto contenido de materia orgánica, lo cual podría permitir la acumulación y persistencia de las cianotoxinas por medio del material tóxico presente en sedimentos.

Finalmente, los valores obtenidos de los índices de estructura de comunidades, indican que el embalse Porce II es un ambiente muy contaminado, con una alta dominancia, especialmente de *Microcystis* spp. y, por ende, posee una baja diversidad y una mínima equidad en cuanto a la comunidad fitoplanctónica. Estos resultados reflejan como la contaminación acuática afecta la diversidad de especies y de este modo, simplifica el ecosistema. En consecuencia, se advierte el riesgo de un efecto no deseable en la conservación de la calidad del agua del embalse y la necesidad de un seguimiento, en particular de su estado trófico y la proliferación de cianobacterias.

6. CAPÍTULO 2: EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE ELIMINACIÓN E INACTIVACIÓN DE CIANOBACTERIAS USANDO ULTRASONIDO

6.1. INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias son los microorganismos gran negativos fotosintéticos más antiguos que existen en agua dulce, salobre y marina, así como en ambientes terrestres (Kulabhusan & Campbell, 2021). Estos microorganismos se presentan de diversas formas, filamentosas, unicelulares, coloniales o multicelulares, y habitan todos los entornos posibles, incluso bajo condiciones precarias de luz y nutrientes disponibles (Vidal et al., 2021). La *Microcystis* sp. una de las cianobacterias más generalizadas en ecosistemas de agua dulce, sobrevive al invierno en la zona béntica y se eleva hasta el epilimnio durante el verano, donde puede proliferar y formar floraciones en la superficie del agua (Caramés, 2016). En efecto, su complejidad y adaptabilidad representan un gran reto.

En la actualidad, se han desarrollado y utilizado varios procesos físicos, químicos y biológicos para eliminar y controlar la proliferación de cianobacterias en los sistemas de agua natural (Cobo, 2015). Estos incluyen la reducción de la carga de nutrientes, alguicidas, agentes de recubrimiento de sedimentos, adsorción, filtros, humedales, el aumento de pastoreo, aireación o mezcla, y el ultrasonido (Choi et al., 2022; Liu et al., 2017; Purcell et al., 2012; Zhang et al., 2021). Si bien, todos estos métodos funcionan en cierta medida, cada uno tiene ciertas limitaciones. No obstante, el ultrasonido ha llamado la atención recientemente debido a su operación simple y de bajo impacto en los ecosistemas y el medio ambiente (Yao et al., 2020), y específicamente por su eficiencia en el control de cianobacterias (Munoz et al., 2021; Park et al., 2017).

La reducción en el crecimiento algal se da mediante la destrucción estructural o funcional de las células (Rajasekhar et al., 2012a). Cuando se aplica radiación ultrasónica al agua, se producen diversos efectos físicos y químicos. Entre estos, el efecto de pirólisis, de oxidación de radicales libres y de cizallamiento mecánico producido por la cavitación, los cuales pueden llegar a destruir la pared celular o la estructura de la membrana celular (Chen et al., 2020). Además, se ha observado que las diferencias morfológicas y fisiológicas entre especies hacen que las estructuras celulares tengan diferente sensibilidad al ultrasonido, siendo las algas filamentosas mucho más susceptibles que las algas unicelulares; y cuyo daño se localiza principalmente en las uniones celulares (Purcell, 2009; Purcell et al., 2013).

Así mismo, la aplicación de ultrasonido podría aumentar la permeabilidad de la membrana celular de *Microcystis aeruginosa* y, adicionalmente, inhibir eficazmente la fotosíntesis de las algas al destruir el pigmento fotosintético de las células (Tang et al., 2004). Cabe destacar entonces, que se tienen dos rutas de inactivación; la destrucción de la integridad celular, que aumenta sus tendencias de sedimentación, y la destrucción del sistema fotosintético, que disminuye la fotosíntesis, es decir, la absorción de dióxido de carbono (CO_2) y la liberación de O_2 (Peng et al., 2020). Por lo tanto, es posible inhibir las actividades fisiológicas de *Microcystis* sp. por medio de ultrasonido (Tan et al., 2018); sin embargo, vale la pena evaluar hasta qué nivel se busca impactar en la estructura y funcionamiento celular, con el fin de lograr dicha inhibición manteniendo la integridad de las células y evitando la disrupción celular, que conlleva a la liberación de compuestos intracelulares perjudiciales (Huang et al., 2020).

6.2. METODOLOGÍA

Inicialmente, se llevó a cabo un conteo de número de células y colonias de *Microcystis* spp., utilizando un microscopio óptico triocular de contraste de fases modelo Eclipse E200 (Nikon, EE.UU.) (ver Figura 20). Además, se usó el programa IC Measure (The Imaging Source, EE.UU.) para facilitar su visualización, por medio de la conexión USB de una cámara Z14-HD (Nikon, EE.UU.) de 14MP acoplada al microscopio. Para el conteo, se utilizó una cámara de Neubauer (Boeco, Germany), la cual cuenta con dos campos y permite hacer dos recuentos simultáneamente. De este modo, se seleccionaron aleatoriamente 3 cuadrantes de ambos campos, los cuales cuentan con 16 cuadrículas cada uno. Las observaciones se realizaron a una magnificación total de 400X y 100X para el número de células y colonias, respectivamente. Cada muestra se homogenizó completamente y se emplearon 30 µL. Para calcular la densidad celular por mL, se multiplicó el valor promedio obtenido por el factor de dilución de la cámara que es de 5.000. En el caso de los controles, fue necesario diluir en un factor de 10 veces, llevando 100 µL de muestra a un eppendorf de 1 mL y aforando con agua destilada.

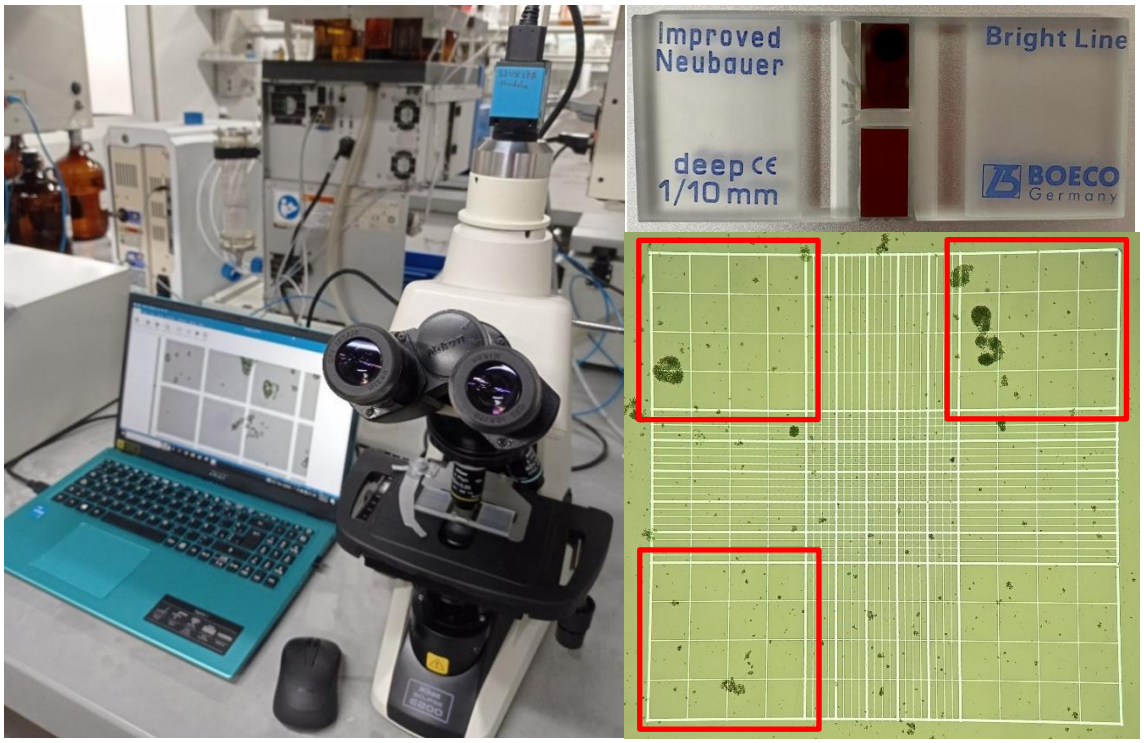


Figura 20. Microscopio óptico Nikon y cámara de Neubauer.

Adicionalmente, con el propósito de evaluar el impacto en la estructura y funcionamiento de las células cianobacterianas, y, por ende, en la viabilidad de estos organismos, se realizó un análisis celular mediante citometría de flujo, a través del Grupo de Citometría de la Universidad de Antioquia. Se empleó un kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD BacLight de Molecular Probes (Eugene, EE.UU.), referencia L7007, que consiste en una mezcla de dos tinciones, SYTO 9 5 mM (ácido nucleico verde fluorescente) e yoduro de propidio (PI) 10 µg/mL (ácido nucleico rojo fluorescente). Así, las bacterias con membranas celulares intactas (vivas) se tiñen de verde fluorescente, mientras que las bacterias con membranas dañadas (muertas) se tiñen de rojo fluorescente. El fondo permanece virtualmente no fluorescente. Se midió una muestra de control sin teñir para proporcionar la fluorescencia celular de referencia. Adicionalmente, se activó un

filtro para la detección de clorofila, a longitudes de onda de 650, 700 y 750 nm teniendo en cuenta los máximos de excitación/emisión de las cianobacterias. Por último, inmediatamente después de cada ensayo se tomaron 200 µL de muestra y se añadió 1 µL de SYTO 9 y 1 µL de PI. Luego, se homogenizó la suspensión por medio de un agitador vortex y se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad durante 15 min. Se realizó la lectura en un CytoFLEX (Beckman Coulter, EE.UU.) (ver Figura 21), utilizando láser azul a 488 nm para excitar los tintes. SYTO 9 se detectó a 530 nm y PI a 610 nm. Finalmente, se empleó el programa CytExpert (Beckman Coulter, EE.UU.) para la recopilación de datos.

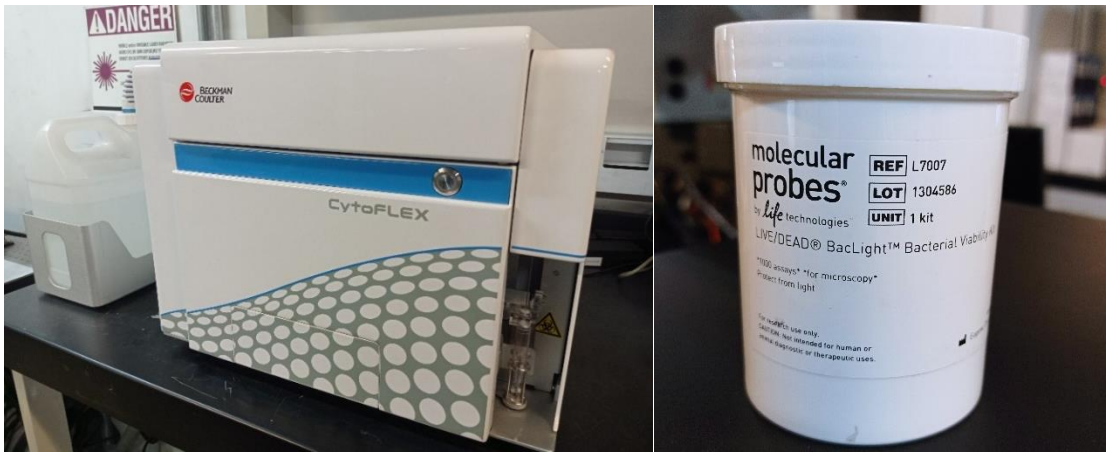


Figura 21. Equipo CytoFLEX y kit LIVE/DEAD BacLight.

Por otra parte, en cuanto a la flotabilidad de las células cianobacterianas, se realizaron pruebas de sedimentación que consistieron en observar su posición en la columna de agua, luego de ser sometidas al proceso de sonicación. Se tomaron 10 mL de muestra en falcon de 15 mL, y se hizo un seguimiento de su evolución transcurridas 8, 24, 48 y 72 h. El montaje se dejó en un espacio con ingreso de luz natural y libre de perturbaciones externas que causara la resuspensión de las células.

Finalmente, con el objetivo de optimizar las condiciones de operación para obtener la máxima respuesta, en este caso el porcentaje de eliminación de las células cianobacterianas, los resultados obtenidos del proceso de sonicación se analizaron a través del software Statgraphics Centurion 19 (Statpoint, USA), usando la metodología de superficie de respuesta, por medio de un diseño factorial de 3 niveles (3^2), el cual muestra los efectos de 2 factores, la potencia y el tiempo de exposición, en 12 ejecuciones, incluyendo 3 puntos centrales. Las corridas se ejecutaron de forma aleatoria y se seleccionó un nivel de confianza del 95%. Así mismo, se construyó un modelo de regresión de segundo orden, según la Ecuación (5) y se realizó un análisis de varianza (ANOVA), el cual es una herramienta estadística que da a conocer la significancia de cada término considerado en el modelo (Montgomery, 2017). De esta manera, los valores altos de razón-F y los valores bajos de valor-P indican la importancia de cada término en el modelo de regresión construido, considerando que los coeficientes con valores P<0,05 son estadísticamente significativos.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{2}(\beta_i x_i) + \sum_{i=1}^{2}(\beta_{ii} x^2{}_{ii}) + \sum_{i=1}^{2}\sum_{j=1,i<j}^{2}\left(\beta_{ij} x_i x_j\right) + \varepsilon \qquad (5)$$

donde y representa el porcentaje de eliminación de células cianobacterianas; β_0 es el intercepto; β_i, β_{ii} y β_{ij} son los coeficientes de regresión lineal, cuadrática y de interacción, respectivamente;

x_i denota los niveles de las variables independientes y ε se refiere al error experimental (Rubio-Clemente et al., 2019).

6.3. RESULTADOS

6.3.1. Conteo de cianobacterias

Con el uso del microscopio, se lograron observar múltiples colonias de *Microcystis* spp., con gran variedad de tamaños y formas en la muestra de agua. El tamaño promedio de esta formación de agregados osciló entre 300 y 400 µm. Uno de los efectos más evidentes luego del tratamiento con ultrasonido sobre las cianobacterias, fue una notable disminución tanto en el número como en el tamaño de las colonias, permitiendo la disgregación de las células mediante la pérdida del mucílago que las mantiene unidas (ver Figura 22). A medida que se aumentó la potencia del proceso de sonicación fue mayor el efecto de disgregación (ver Gráfica 1). Partiendo de un promedio de 6,94E+04 colonias/mL, se alcanzó una reducción cerca del 90% de las colonias, bajo una potencia máxima de 50 W y a una frecuencia fija de 40 kHz, luego de 30 min de exposición a las ondas de ultrasonido. Un efecto muy similar se obtuvo bajo la potencia media de 30 W, sin embargo, el aumento en la potencia aceleró el proceso a partir de 5 min. Bajo la potencia mínima de 10 W, se observó una menor afectación, incluso por debajo del 50%.

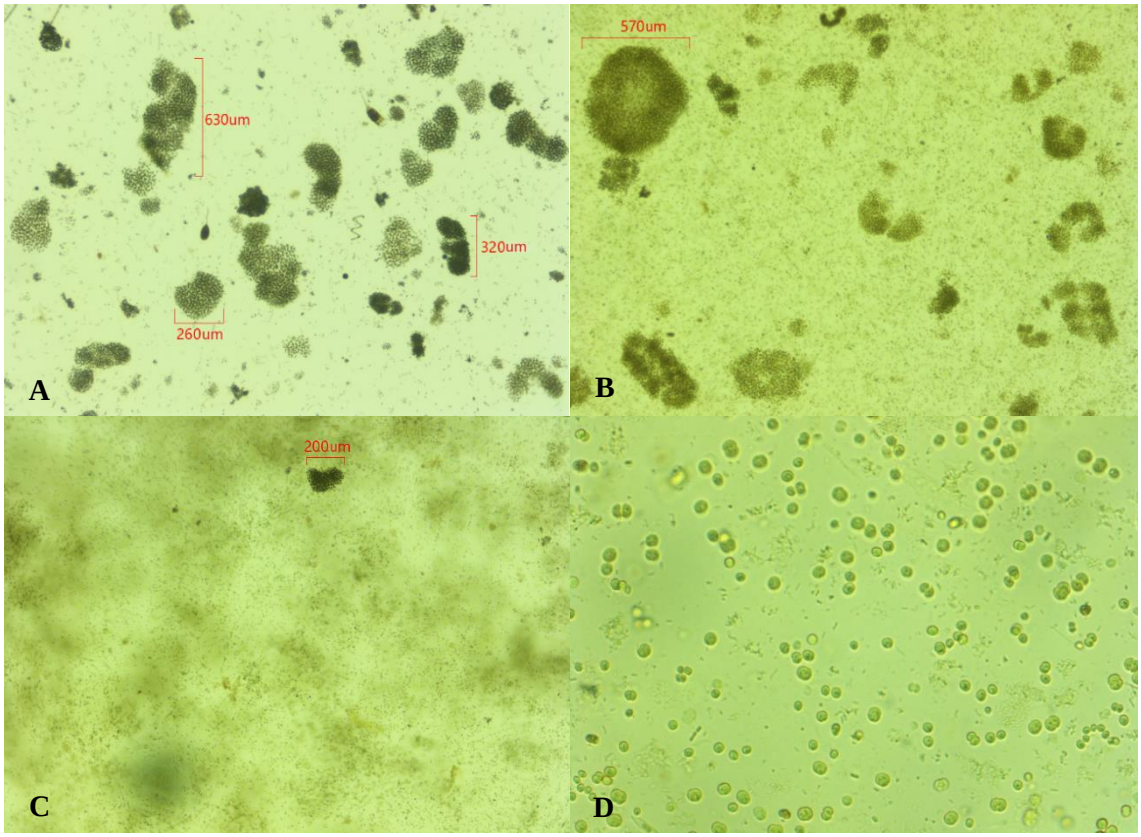
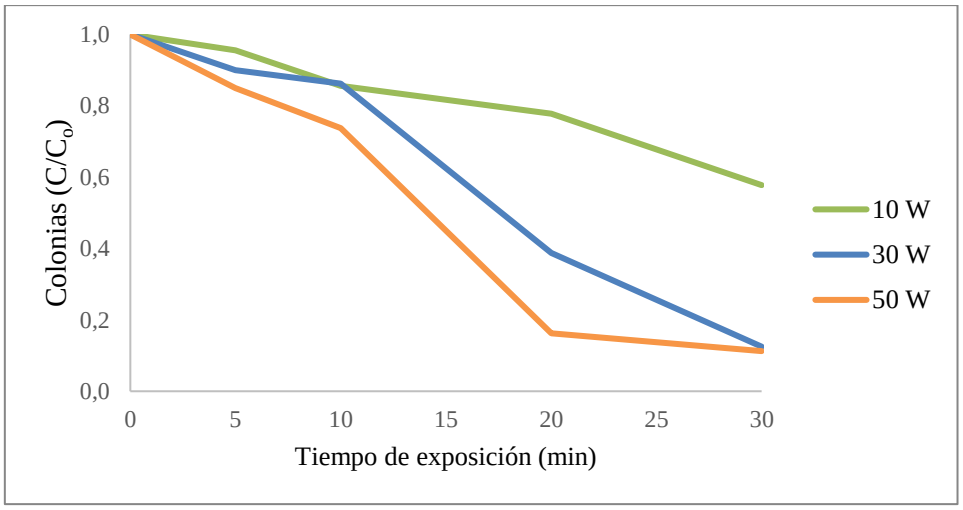
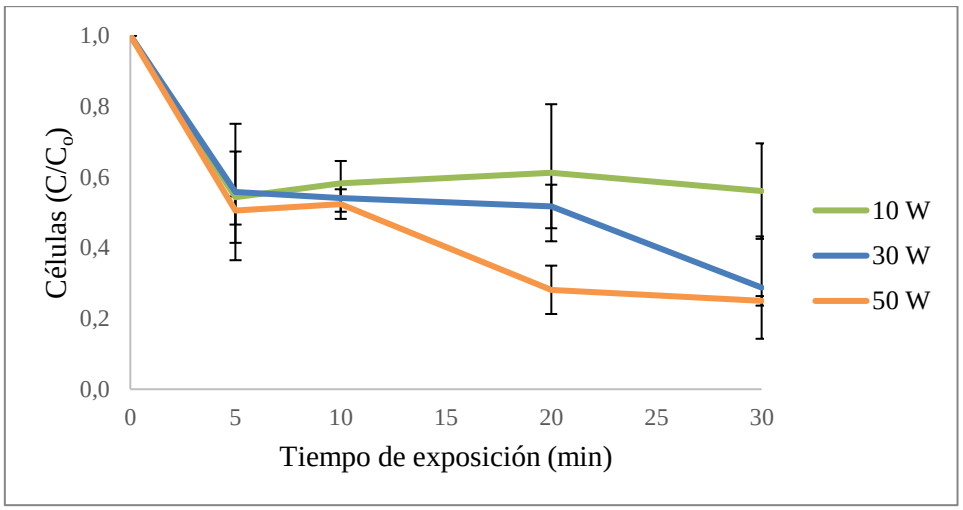


Figura 22. Tamaño de las colonias de *Microcystis* spp. (40X): A: Control sin sonicar, B: Potencia mínima (10 W/30 min), C: Potencia máxima (50 W/30 min), D: Células disgregadas (50 W/30 min) (400X).



Gráfica 1. Reducción de colonias bajo diferentes potencias a 40 kHz.

Así mismo, se observó una reducción significativa de la densidad celular, proporcional al aumento de la potencia de sonicación (ver Gráfica 2). Partiendo de un promedio de 2,58E+06 células/mL, se obtuvo rápidamente una eliminación casi del 50% de células cianobacterianas, bajo las tres potencias evaluadas en tan solo 5 min. A partir de ese momento, se mantuvo estable la cantidad promedio de células en la muestra sometida a una potencia mínima de 10 W. No obstante, transcurridos 30 min de la aplicación de ultrasonido bajo las potencias media y máxima de 30 y 50 W, se alcanzaron porcentajes de eliminación de hasta el 72,4 y 74,9% de células, respectivamente. Incluso, a partir de 20 min bajo la potencia máxima ya se había obtenido un 72,3% de eliminación, mientras que bajo la potencia media apenas comenzaba a incrementarse el efecto sobre las células.

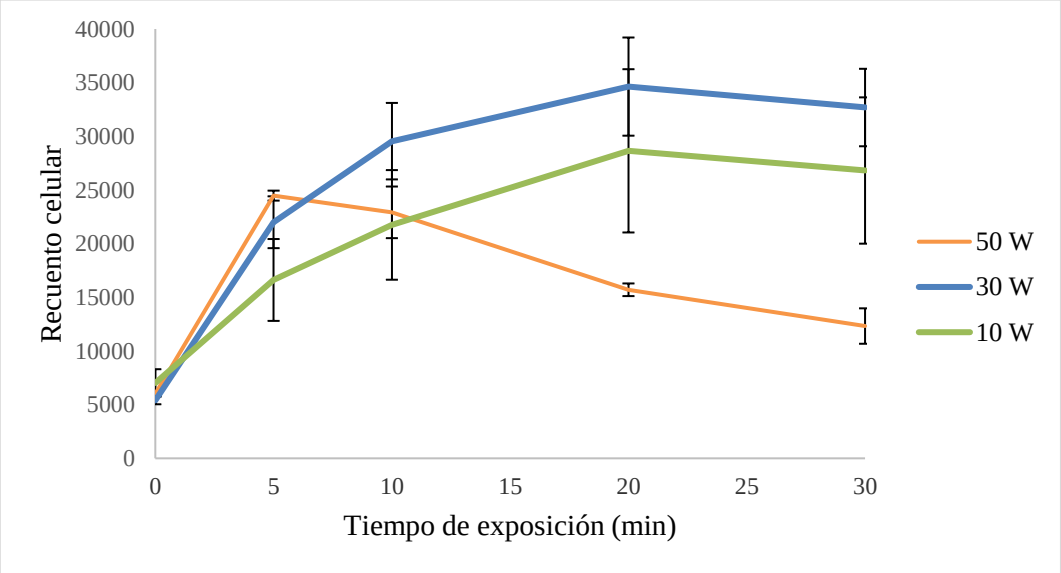


Gráfica 2. Eliminación de cianobacterias bajo diferentes potencias a 40 kHz.

6.3.2. Citometría de flujo

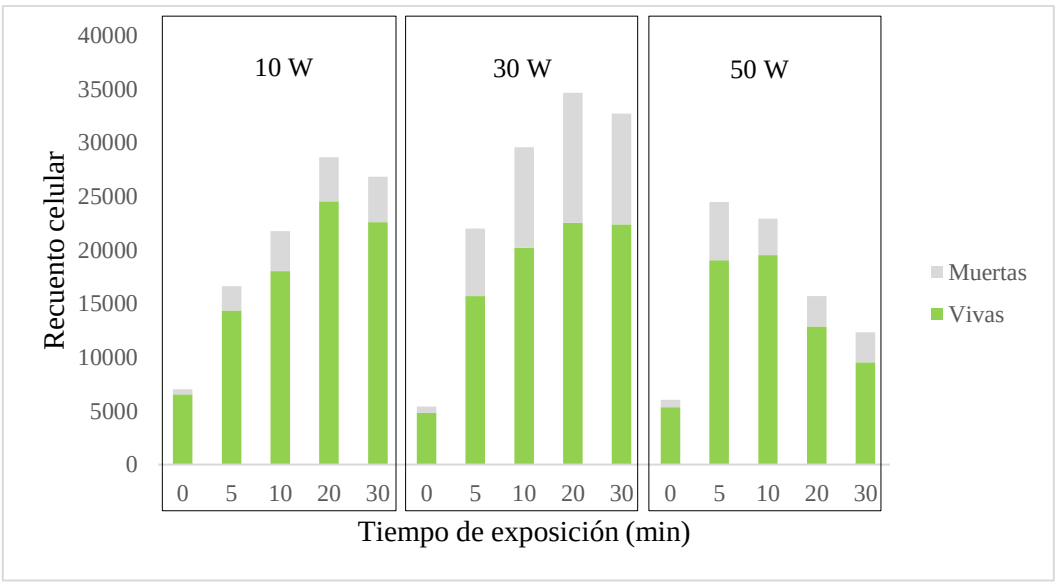
La integridad celular se determinó usando citometría de flujo en combinación con sondas fluorescentes. Por medio de un filtro o detector de clorofila, se discrepó el recuento de células a partir del número total de eventos, para cada ensayo de sonicación. De esta forma, se registraron aproximadamente 6000 eventos para las muestras control, en las regiones viables y no viables.

En la Gráfica 3, se observa el recuento positivo para clorofila a 650 nm tras los ensayos de sonicación bajo diferentes potencias y a una frecuencia fija de 40 kHz. Es evidente el incremento en el recuento a medida que se prolonga el tiempo de exposición, esto debido a la disgregación celular expuesta en el apartado 6.3.1., sin embargo, bajo la potencia máxima de 50 W se alcanza una rápida disminución en el recuento a partir de 5 min, pero, aun así, superando el recuento inicial culminados los 30 min de tratamiento ultrasónico.



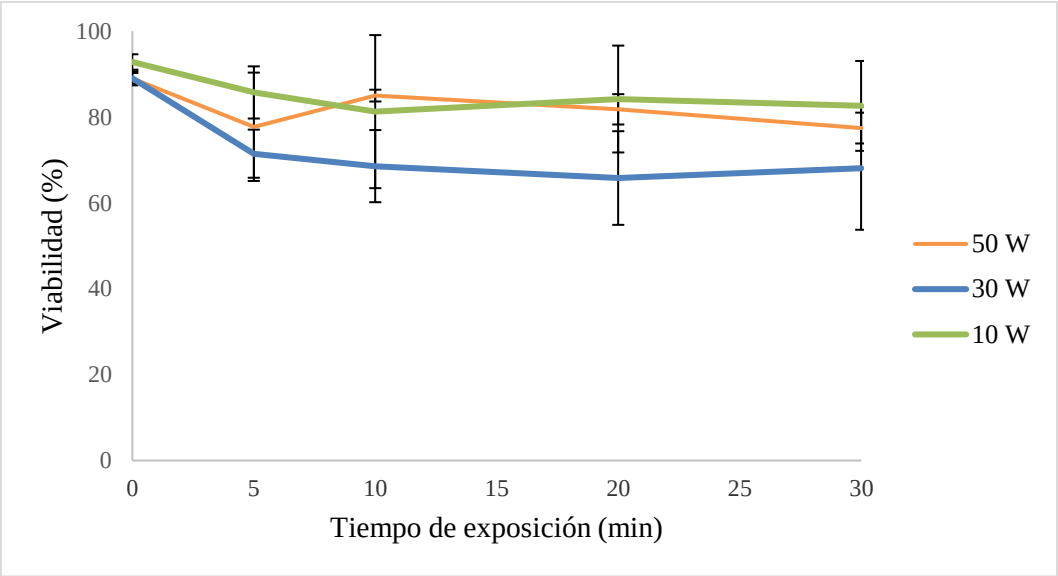
Gráfica 3. Recuento celular bajo diferentes potencias a 40 kHz.

Por otro lado, la Gráfica 4 indica que la potencia media de 30 W tuvo un mayor impacto en la integridad celular, obteniendo mayor cantidad de células muertas, mientras que el impacto de la potencia máxima de 50 W fue mayor en cuanto a la eliminación o disminución en la densidad celular, como se observó en la Gráfica 2.



Gráfica 4. Recuento de células vivas y muertas bajo diferentes potencias a 40 kHz.

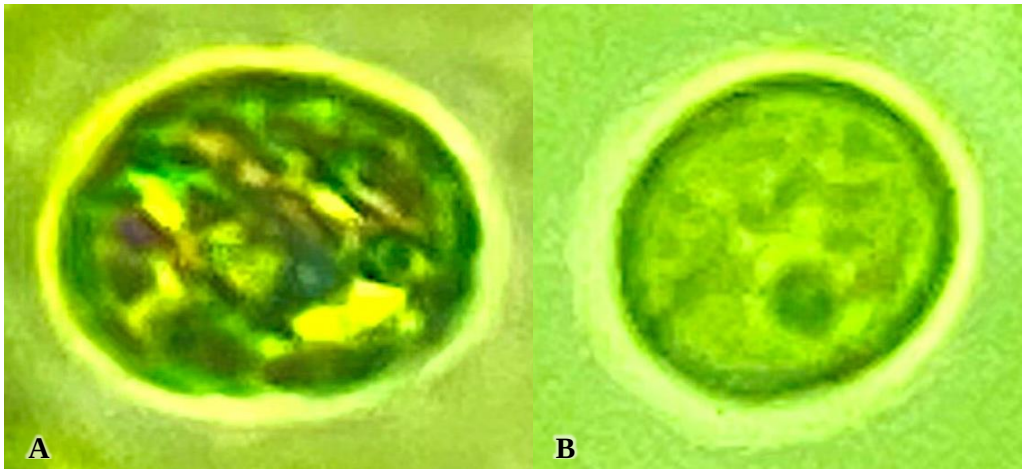
En contraste, en la Gráfica 5, se observa el porcentaje de viabilidad de las células cianobacterianas, teniendo en cuenta el daño celular provocado. Los resultados sugieren que no se infligió una afectación celular grave en las cianobacterias que lograron permanecer íntegras luego de someterse al ultrasonido, por lo que el porcentaje de disminución de la viabilidad fue mínimo y se sostuvo alrededor del 80% aproximadamente.



Gráfica 5. Viabilidad celular bajo diferentes potencias a 40 kHz.

6.3.3. Pruebas de sedimentación

Al detallar la estructura de la célula (ver Figura 23), por medio de microscopia óptica, es evidente una pérdida de sus orgánulos celulares tras el tratamiento ultrasónico. Sin embargo, las células afectadas conservan su forma intacta y pareciera no haber afectación externa en su pared celular. En consecuencia, se logró el colapso de las vacuolas de gas al emplear incluso una potencia mínima de 10 W a una frecuencia fija de 40 kHz. No obstante, también se observó restos celulares dispersos en la matriz, lo cual se refleja en el descenso del recuento celular.



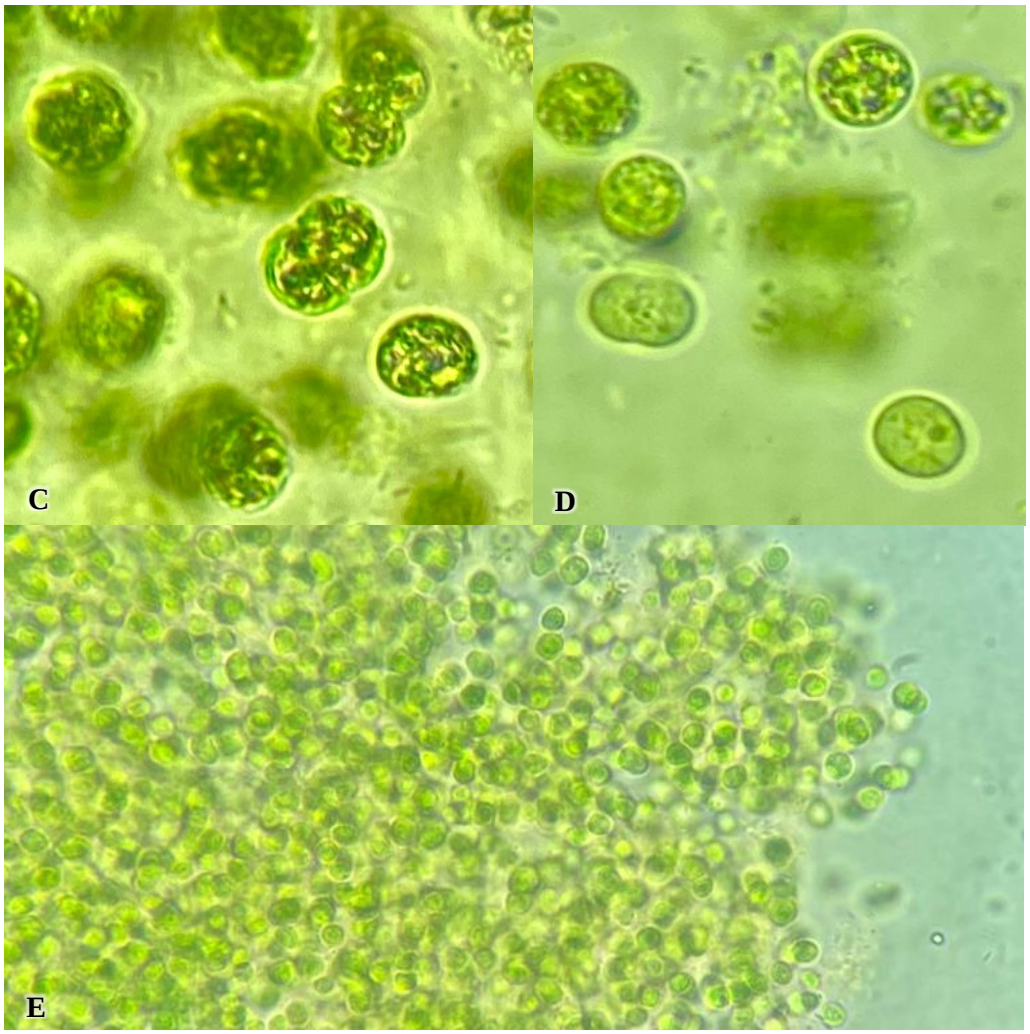


Figura 23. *Microcystis* spp. (1000X): A: Detalle de las vacuolas de gas en la célula sin sonicar, B: Aspecto de la célula tras sonicar, C: Colonia con células sin sonicar, D: Colonia con células afectadas tras la sonicación (50 W/30 min), E: Colonia con células afectadas tras la sonicación (10 W/30 min) (400X).

Por medio de las pruebas de sedimentación (ver Figura 24), se observó que, a partir de un tiempo de exposición de tan solo 5 min bajo las tres potencias de ultrasonido evaluadas, fue posible la sedimentación de las células cianobacterianas. La velocidad de sedimentación fue mayor dentro de las primeras 24 h, aunque en tan solo 8 h ya era evidente el descenso de las células, y, a partir de ahí, su efecto se sostuvo de forma prolongada. De este modo, las células permanecieron en el fondo. Al realizar el seguimiento durante 8, 24, 48 y 72 h, no se produjo el ascenso hacia la superficie, a excepción de una pequeña recuperación de la capacidad de flotabilidad que se evidenció en la muestra sometida a potencia mínima (10 W) durante 5 min de exposición, luego de 72 h (ver Figura 25). Adicionalmente, con respecto a las imágenes A, B y C, es posible notar una disminución visible en el volumen celular a medida que se aumenta la potencia ultrasónica y el tiempo de exposición, en relación con las tasas de reducción de la densidad celular que se presentaron en la Gráfica 2. Cabe resaltar, además, la coloración verde del agua tras 20 min de exposición bajo la potencia media y máxima (30 y 50 W), lo que sugiere una mayor afectación en la integridad celular al permitir la liberación de pigmentos clorofílicos al agua.

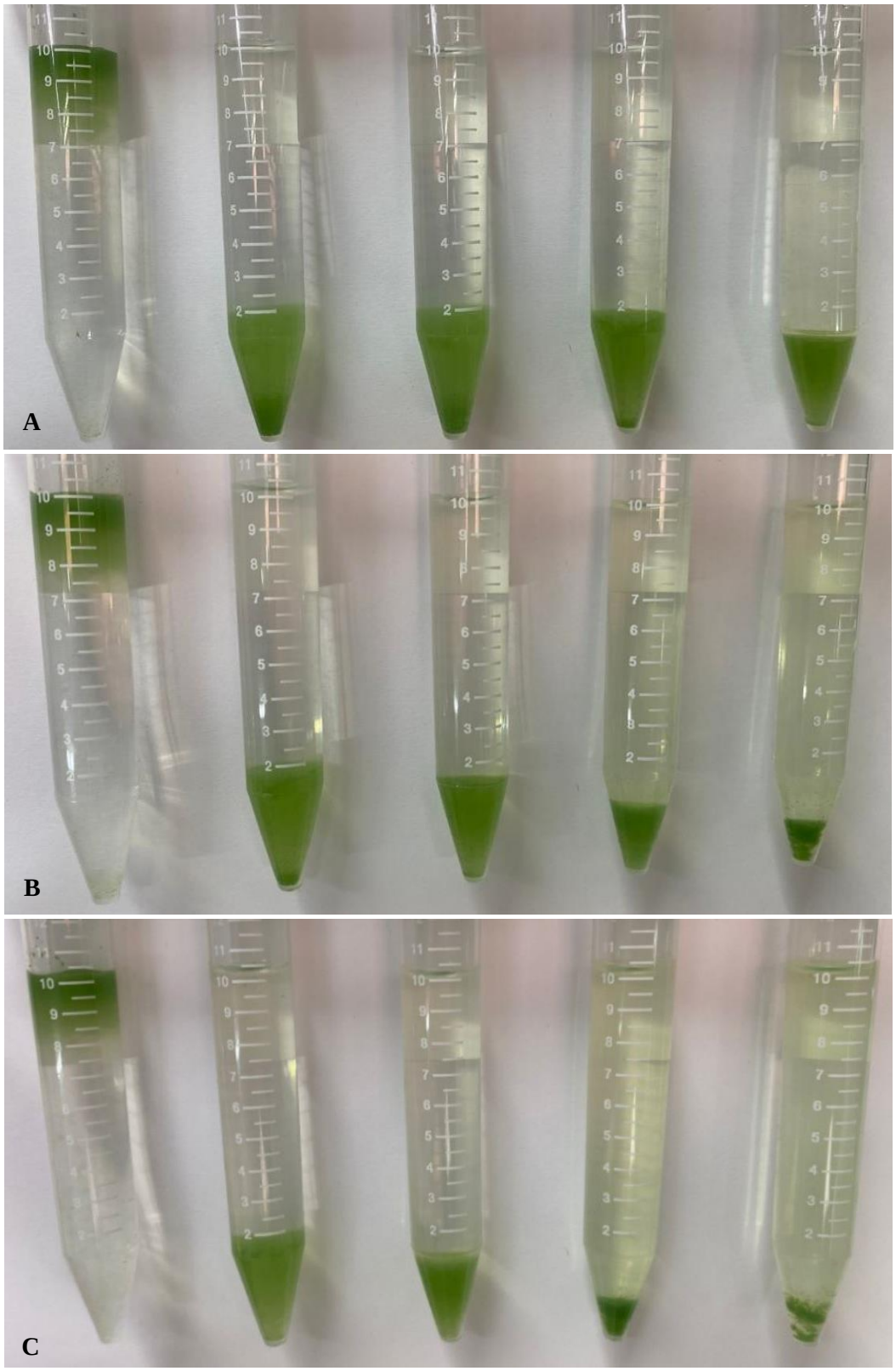


Figura 24. Pruebas de sedimentación transcurridas 48 h de los ensayos de sonicación, bajo diferentes potencias y tiempos de exposición de 0, 5, 10, 20 y 30 min, respectivamente: A: Potencia mínima (10 W), B: Potencia media (30 W), C: Potencia máxima (50 W).

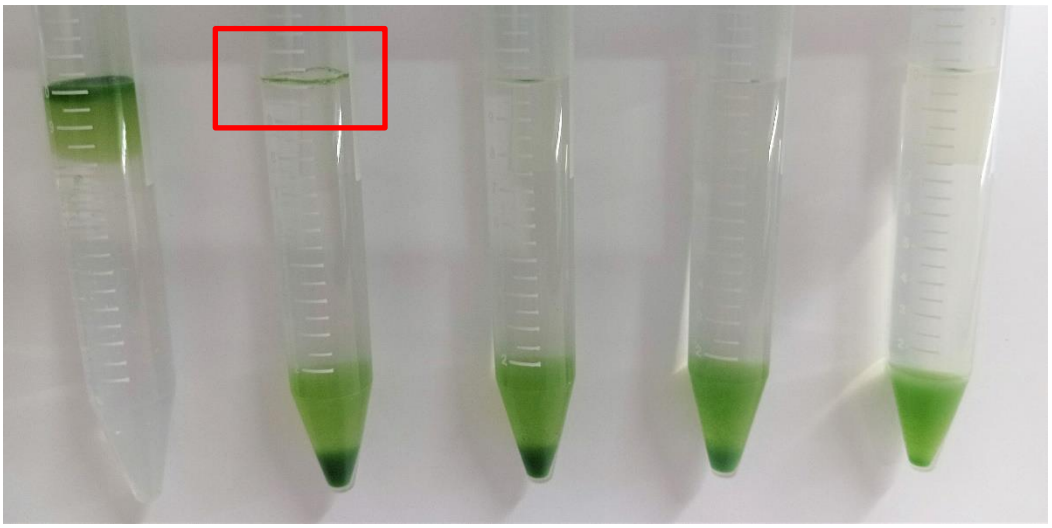


Figura 25. Prueba de sedimentación transcurridas 72 h del ensayo de sonicación, bajo la potencia mínima (10 W) y tiempos de exposición de 0, 5, 10, 20 y 30 min, respectivamente.

6.3.4. Análisis de superficie de respuesta

En la Tabla 6, se compila la matriz de diseño experimental y los valores de eliminación observados y estimados. Adicionalmente, en la Tabla 7 se muestra la prueba ANOVA que cuantifica la influencia de los factores seleccionados en la tasa de eliminación de células cianobacterianas.

Tabla 6. *Eficiencia de eliminación de células y matriz DOE mediante el proceso de sonicación.*

	Factor		**Respuesta**	
Corrida	Potencia (W)	Tiempo (min)	Eficiencia de eliminación experimental (%)	Eficiencia de eliminación predicha (%)
1	10	10	42,3	38,6
2	30	10	46,3	43,6
3	50	10	47,4	48,6
4	10	20	40,3	41,9
5	30	20	48,8	53,0
6	50	20	72,3	64,2
7	10	30	45,1	45,1
8	30	30	72,4	62,4
9	50	30	74,9	79,7
10	30	20	50,1	53,0
11	30	20	48,8	53,0
12	30	20	47,5	53,0

Tabla 7. *ANOVA para el modelo desarrollado que describe la eliminación de células mediante el proceso de sonicación.*

Fuente	GL	Eliminación (%)			
		SC	CM	Razón-F	Valor-P
A: Potencia	1	745,935	745,935	20,70	0,0019
B: Tiempo	1	530,16	530,16	14,72	0,0050
AB	1	152,523	152,523	4,23	0,0736
Error total	8	288,219	36,0274		
Total	11	1716,84			

Nota. GL: grado de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: cuadrado medio.

En la Ecuación (6) se indica el modelo de regresión de segundo orden que describe la eficiencia de eliminación de células cianobacterianas mediante el proceso de sonicación estimado por la superficie de respuesta. De acuerdo con la ecuación del modelo ajustado, se puede observar la influencia de los efectos principales y de su interacción.

$$\text{Eliminación (\%)} = 36{,}0167 - 0{,}06 * \text{Potencia} + 0{,}01375 * \text{Tiempo} + 0{,}030875 * \text{Potencia} * \text{Tiempo} \quad (6)$$

El estadístico R^2 indica que el modelo ajustado, explica 83,2% de la variabilidad de la variable respuesta. La Figura 26 representa el efecto de los parámetros de sonicación en la tasa de eliminación de células cianobacterianas. A medida que aumenta la potencia y el tiempo de exposición del ultrasonido, también aumenta el porcentaje de eliminación de células cianobacterianas. De esta forma, se obtuvo la máxima respuesta en el nivel alto de ambos factores, es decir, 50 W y 30 min. Concretamente, los porcentajes de eliminación fueron del 45,1%, 72,4% y 74,9% a valores de 10, 30 y 50 W, respectivamente, a una frecuencia fija de 40 kHz tras 30 min de reacción.

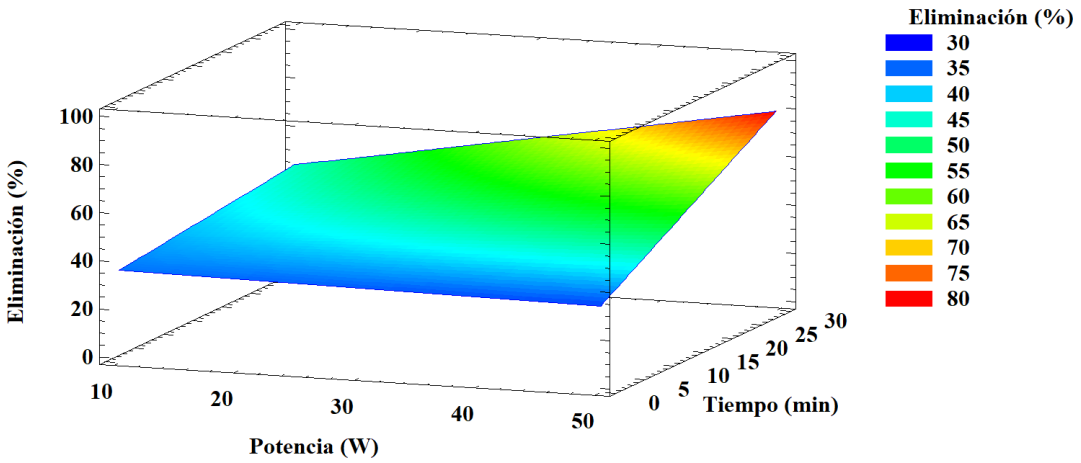


Figura 26. Superficie de respuesta estimada para la eliminación (%) utilizando el proceso de sonicación: frecuencia = 40 kHz; tiempo de reacción = 10, 20, 30 min; potencia = 10, 30, 50 W.

En este caso, tal como se muestra en la Figura 27, tanto la potencia como el tiempo de exposición tienen un efecto significativo y directamente proporcional en la eliminación de células cianobacterianas tras la aplicación de ultrasonido de baja frecuencia. Por el contrario, la interacción entre ambos factores no tiene un efecto significativo en la tasa de eliminación. Adicionalmente, se observa cómo el incremento en la potencia tiene un mayor efecto sobre el porcentaje de eliminación en comparación con la prolongación en el tiempo de exposición.

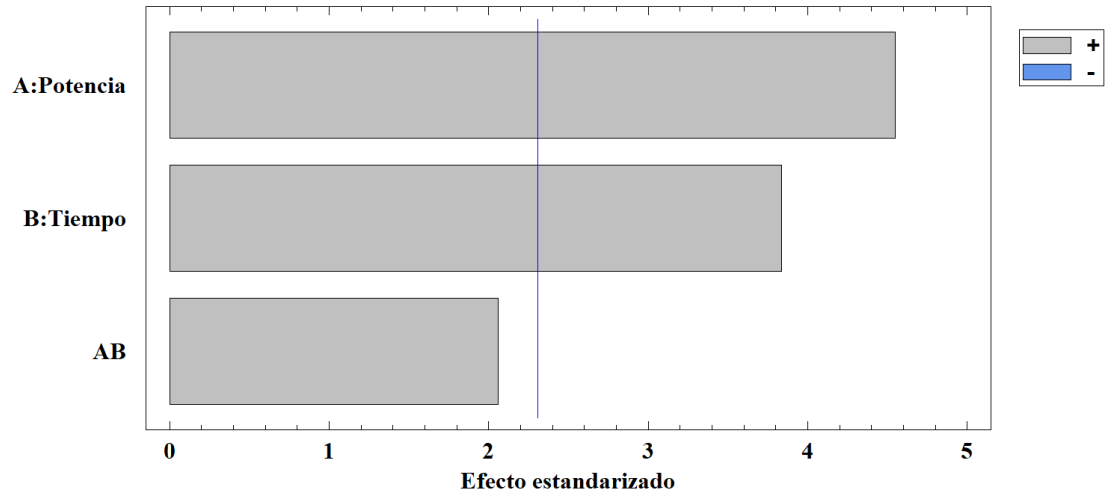


Figura 27. Diagrama de Pareto estandarizado para la eliminación (%).

6.4. DISCUSIÓN

En diferentes estudios se han utilizado varios métodos de evaluación para cuantificar los efectos ultrasónicos en el control de algas, entre estos los más destacados son: microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido (SEM), citometría de flujo y clorofila-a (Chl-a) (Franklin, 2021; Park et al., 2019). En general, los recuentos de células bajo un microscopio y las concentraciones de Chl-a se miden para representar la biomasa de algas, y, así mismo, la densidad óptica (DO) es utilizada como indicador de la densidad celular. No obstante, es importante comprender el mecanismo de los métodos analíticos con el fin de evitar una inadecuada interpretación.

Joyce et al. (2010) probaron la remoción de *Microcystis aeruginosa* bajo varias frecuencias (20, 40, 580, 864 y 1146 kHz) obteniendo en orden de eficiencia de eliminación 20 < 1146 < 864 < 580 kHz. El resultado bajo 40 kHz fue excluido debido a un aumento en la concentración de algas después de 20 min (Joyce et al., 2010). En las Gráficas 3 y 4 del presente trabajo, se presentaron resultados similares, donde el recuento celular obtenido mediante citometría de flujo aumentó con el tiempo de exposición. Sin embargo, Park et al. (2017) indicaron que debe tenerse en cuenta que el ultrasonido de baja frecuencia (20-40 kHz) puede causar la disgregación de grumos de algas, lo que puede cambiar la DO de una solución de prueba (Park et al., 2017). Así mismo, Wang et al. (2014) obtuvieron un aumento en el número de células en los primeros 2 min bajo ultrasonido a 20 kHz, al romper los agregados celulares para posteriormente formar células individuales. Adicionalmente, indica que si hay suficiente energía de ultrasonido para actuar sobre las células individuales, algunas de estas se dividen en fragmentos de células (Wang et al., 2014). En este sentido, la dispersión de células aglomeradas y la producción de fragmentos de células, aumentan en efecto los recuentos celulares, por lo cual resulta conveniente contrastar con los conteos al microscopio.

Del mismo modo, para Peng et al. (2020), el ultrasonido de 20 kHz con una intensidad de 0,038 W/mL también tuvo poco efecto sobre las células algales, obteniendo un aumento en el número de células después de 2 min y alcanzando una tasa de eliminación del 10,5% después de 15 min, por lo que sugirieron que la entrada de energía del ultrasonido de 20 kHz probablemente no fue suficiente para eliminar las células de *Microcystis aeruginosa* (Peng et al., 2020). No obstante,

Wu et al. (2012) midieron la reducción de células por medio de una cámara de Neubauer y validaron los datos obtenidos usando DO680. Este primero indicó una reducción del 91,54%, mientras que las mediciones de la DO mostraron una reducción de tan solo 44,63% en las mismas condiciones (Wu et al., 2012). Según Park et al. (2017), esta diferencia probablemente se debe a que con la cámara de Neubauer se mide solo el número entero restante, mientras que la DO mide el total de organismos suspendidos, contando las células rotas en suspensión (Park et al., 2017). Lo anterior justifica el hecho de haber obtenido tasas de reducción de hasta 74,9% en la concentración de células por medio del conteo con la cámara de Neubauer, mientras que el recuento por medio de citometría de flujo aumentó significativamente y a pesar de una posterior reducción, en este caso la concentración de algas fue mayor que la concentración inicial de células después de un tratamiento de 30 min.

Por otro lado, se ha demostrado que aumentar la intensidad (o potencia) ultrasónica reduce en mayor medida la concentración de células de algas (Dehghani, 2016). No obstante, las células de algas, como *Microcystis* sp., pueden romperse fácilmente con intensidades ultrasónicas altas. Liu et al. (2016) informaron que casi el 90% de las células de algas se rompieron después de la sonicación (40 kHz, 1 W/mL) durante 1 min (Liu et al., 2016). De este modo, aunque Rajasekhar et al. (2012b) observaron que la sonicación a baja frecuencia (20 kHz) con alta intensidad (0,32 W/mL) fue eficaz para inhibir el crecimiento de células de *Microcystis aeruginosa* (Rajasekhar et al., 2012b), otros estudios han indicado que aumentar la intensidad puede llegar a ser contraproducente, ya que a pesar de acelerar la tasa de eliminación de las células de algas, puede generar disrupción celular. Zhang et al. (2006a) encontraron que la liberación de toxinas aumentó significativamente bajo una potencia superior a 48 W, por lo tanto, recomendaron el uso de una potencia ultrasónica inferior (Zhang, et al., 2006a). Adicionalmente, Peng et al. (2020) indicaron que la ultrasonicación puede conducir también a la liberación de materia orgánica intracelular (MOI), que consiste principalmente en compuestos proteicos, clorofila y sustancias húmicas (Peng et al., 2020). Así mismo, un tratamiento ultrasónico excesivo, según los hallazgos de Tan et al. (2018), puede provocar un aumento de los nutrientes disueltos (N y P) debido a la alteración celular, por lo que sugieren el uso de una frecuencia de 35 kHz bajo una intensidad ultrasónica controlada a 0,035 W/mL, aplicada durante 20 min (Tan et al., 2018). Se espera entonces, inhibir de manera efectiva las actividades fisiológicas de *Microcystis* spp. sin generar disrupción celular marcada evitando la liberación de inclusiones celulares que pueden generar efectos adversos. En este sentido, es entendible la coloración verde del agua (ver Figura 24) luego de 20 min, al provocar la liberación de pigmentos fotosintéticos bajo las potencias de 30 y 50 W, evidenciando una mayor afectación en la integridad celular tras la sonicación prolongada.

En consecuencia, la eliminación de células cianobacterianas resulta ser apropiada a través de la pérdida de flotabilidad por el colapso ultrasónico de las vacuolas de gas, mientras se mantiene la integridad celular; siendo lo más propicio para la seguridad del entorno acuático (Hu & Rzymski, 2019). Si bien, solo el ultrasonido de baja frecuencia puede hacer que las vacuolas de gas resuenen y colapsen (Chen et al., 2020). De este modo, la inhibición del crecimiento de las células cianobacterianas se atribuye principalmente al efecto de la sonicación sobre las vacuolas de gas, por lo que Rajasekhar et al. (2012b) encontraron que en otras especies de algas como la *Chlorella* spp. que carece de dichos organelos, el impacto de la cavitación acústica fue mínimo bajo las mismas condiciones (Rajasekhar et al., 2012b). Adicionalmente, la implosión de las burbujas de cavitación destruye el sistema fotosintético de las células de algas, la estructura de la ficobiliproteína y la clorofila, afectando el metabolismo energético y la conversión de sustancias;

esto reduce la fotosíntesis y mejora la sedimentación celular (Peng et al., 2020). Del mismo modo, Chen et al. (2020) evidenciaron una disminución en la tasa de producción de O_2 de la fotosíntesis (Chen et al., 2020); al igual que Zhang et al. (2006b), cuyo efecto del ultrasonido de baja frecuencia (25 kHz, 0,32 W/mL) resultó en una disminución sobre el contenido de Chl-a, ficobiliproteína y la tasa de liberación de O_2 de la fotosíntesis, tras 5 min de tratamiento (Zhang, et al., 2006b). Se reportó, además, que es mucho mayor el daño de la ficobiliproteína por ultrasonido que el de la Chl-a (Chen et al., 2020).

La ultrasonicación produce además cambios morfológicos en *Microcystis* sp., lo que permite evidenciar su impacto en la estructura celular. Así, Peng et al. (2020) lograron comprobar la ruptura de las vacuolas de gas, al observar por medio de imágenes SEM una disminución del tamaño celular y arrugas en la superficie celular (Peng et al., 2020). Así mismo, Park et al. (2019) observaron que aunque no hubo alteración perceptible de la membrana celular mediante imágenes SEM, la afectación de las células fue clara mediante imágenes TEM, incluso bajo la frecuencia más baja de 36 kHz a 300 W, mostrando una notable reducción o encogimiento de las vacuolas de gas (Park et al., 2019). En el presente estudio, también fue posible detallar la estructura celular (ver Figura 23) mediante microscopía óptica, indicando que además del colapso de las vacuolas de gas, al emplear una frecuencia fija de 40 kHz bajo las diferentes potencias ultrasónicas evaluadas (10, 30 y 50 W), hubo pérdida de los orgánulos celulares incluso en el mínimo tiempo de exposición de 5 min (ver Figura 24). De hecho, Lee et al. (2001) obtuvieron en tan solo 30 s el asentamiento de las células algales bajo irradiación ultrasónica a 28 kHz y 120 W de potencia (Lee et al., 2001). En este sentido, se espera que la sedimentación limite las condiciones óptimas para el funcionamiento celular, teniendo en cuenta que la disminución en el porcentaje de viabilidad fue mínima (ver Gráfica 5), lo que implica que las células podrían continuar con sus procesos metabólicos, así como la capacidad de producción de toxinas.

Cabe destacar, que luego del colapso de las vacuolas de gas, las células pueden recuperarse bajo condiciones óptimas de aireación e irradiación de luz, tomando aproximadamente 3 días para que la regeneración de las vacuolas de gas sea suficiente para proporcionar flotabilidad nuevamente (Lee et al., 2000; Walsby, 1992). De este modo, Li et al. (2020) encontraron que, luego de 72 h la distribución celular del grupo sonicado casi se restauró al nivel del grupo de control, recuperando la capacidad de flotación (Li et al., 2020). Sin embargo, Rodriguez-Molares et al. (2014), refutaron la idea de que la sedimentación inducida por ultrasonido es un efecto a corto plazo, indicando que después de 14 d de incubación tras la sonicación (21,5 kHz - 8,24 W - 10 min), aunque se observó una ligera recuperación de células en la capa superior, estas seguían siendo un 82% menor que en la muestra de control (Rodriguez-Molares et al., 2014). Al igual que se mostró en la Figura 25, donde un pequeño porcentaje de células migraron a la superficie luego de 72 h, en la muestra sonicada bajo la potencia mínima (40 kHz - 10 W) durante 5 min. No obstante, se requiere mayor investigación para determinar qué tan eficiente será el tratamiento al aplicarse bajo diferentes condiciones ambientales y ultrasónicas.

Por otra parte, aunque la combinación de citometría de flujo con sondas moleculares fluorescentes brinda la oportunidad de evaluar la integridad de la membrana celular de las cianobacterias (Aguilera et al., 2021; Fan et al., 2013; Kozik et al., 2019; Wert et al., 2013), a menudo se dificulta distinguir entre partículas u organismos. De este modo, cabe resaltar que Olusoji et al. (2021) desarrollaron una técnica de agrupación automatizada por medio de un paquete estadístico en R (cyanoFilter) creado para identificar poblaciones de fitoplancton a partir de datos de citometría

de flujo. El algoritmo central del paquete integra la pigmentación y la granularidad de las células de fitoplancton, y su desempeño depende de la similitud de las cepas (Olusoji et al., 2021).

Por último, se destaca la necesidad de centrar esfuerzos en estudios de campo; puesto que la aplicación de ultrasonido resulta ser un método de control efectivo contra la proliferación de algas, en especial sobre cianobacterias, pero, aun así, debe tenerse en cuenta un posible impacto negativo en otros organismos acuáticos importantes para el ecosistema como el zooplancton, los peces y las plantas sumergidas (Cobo, 2015). En este sentido, Chen et al. (2020) estudiaron la influencia del poder ultrasónico (1,5, 2,2 y 50 W) en las criaturas acuáticas (*Elodea nuttallii*, *Daphnia magna*, *Moina mongolina*, *Carassius auratus* y *Macrobranchium nipponense*) tratadas durante 5 min. Los resultados mostraron que con el aumento de la potencia ultrasónica aumentó el número de muertes de *Daphnia magna* y *Moina mongolina*, y, así mismo, hubo una disminución del peso húmedo de *Elodea nuttallii* y *Carassius auratus*, pero no tuvo un efecto significativo sobre *Macrobranchium nipponense* (Chen et al., 2020). En contraste, en el presente estudio se evidenció al microscopio la presencia de diversos protozoos incluso después de la sonicación de las muestras bajo las tres potencias evaluadas (10, 30 y 50 W). Por lo tanto, la sonicación podría utilizarse como una tecnología segura y de bajo impacto en los ecosistemas, aunque hacen falta estudios que permitan obtener un ajuste idóneo de los parámetros de operación. Cabe señalar, que el enfoque que utilizan la mayoría de las pruebas de campo existentes es la exposición continua a ultrasonido de baja potencia a niveles de subcavitación (Park et al., 2017).

6.5. CONCLUSIONES

El ultrasonido de baja frecuencia a 40 kHz bajo 10, 30 y 50 W permitió en un alto porcentaje la eliminación e inactivación de las células cianobacterianas. Tanto la potencia como el tiempo de exposición tuvieron un efecto significativo y directamente proporcional en la eliminación de células cianobacterianas tras el proceso de sonicación. En tan solo 5 min, se alcanzó una eliminación alrededor del 50% de células, bajo las tres potencias evaluadas. El porcentaje máximo de eliminación obtenido fue de 74,9%, luego de 30 min de tratamiento a una potencia de 50 W. Así mismo, se observó el efecto de disgregación en las células, reduciendo el número y el tamaño de las colonias. Adicionalmente, se logró el colapso de las vacuolas de gas al emplear incluso una potencia mínima de 10 W. La sedimentación de las células se dio tras 5 min de tratamiento y su efecto se sostuvo significativamente durante las siguientes 72 h. De este modo, la implementación del ultrasonido resultó ser eficaz para el control de las floraciones de cianobacterias. Sin embargo, el daño celular provocado, en especial, luego de 20 min, produjo la liberación de inclusiones celulares, lo que puede traer repercusiones en el medio ambiente y la salud humana. En este sentido, se hacen necesarios mayores estudios al respecto con el fin de evidenciar la viabilidad del ultrasonido para el tratamiento de agua contaminada con cianobacterias.

7. CAPÍTULO 3: EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE DEGRADACIÓN DE CIANOTOXINAS USANDO ULTRASONIDO

7.1. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas ha aumentado la frecuencia de HAB en las aguas continentales. Se ha encontrado un pronunciado incremento en Asia y África, principalmente en países en vías de desarrollo, dada la intensificación de las actividades humanas y la dependencia a los fertilizantes agrícolas (Hou et al., 2022). En este sentido, un estudio reciente realizado en China, analizó sistemáticamente los reportes de presencia de MCs en lagos y embalses de todo el país y señaló la necesidad de fortalecer el monitoreo y control de MCs en el agua, al ser detectadas en un 100% de 59 lagos y un 84% de 37 embalses (Wei et al., 2022). Colombia no es la excepción. Recientemente se ha identificado la presencia de floraciones cianobacterianas y de MCs de forma recurrente en diferentes embalses de la región (Caly et al., 2022; León & Peñuela, 2019; Loaiza-González et al., 2021; Palacio Gómez et al., 2019). Sin embargo, la presencia de estas sustancias en el agua aún no es abordada por la legislación ambiental colombiana (Munoz et al., 2021), ya que no existe un registro sistemático de floraciones de cianobacterias, a pesar de la gran diversidad de ecosistemas acuáticos del país (Salomón et al., 2020). En el 2011, el Instituto Nacional de Salud (INS) publicó una guía que tiene como objeto establecer directrices para el muestreo en sistemas de distribución destinados para el consumo humano, en cumplimiento con el decreto 1575 de 2007 y sus resoluciones complementarias (INS, 2011). No obstante, hace mención de múltiples compuestos con reconocido efecto adverso en la salud humana, como metales pesados, plaguicidas, bacterias, parásitos, virus, e inclusive contaminantes emergentes, entre otros; pero deja inadvertido el riesgo por la presencia de cianotoxinas en el agua.

Las floraciones algales son comunidades complejas que incluyen cepas coexistentes tóxicas y no tóxicas, donde es posible identificar una variedad de cianobacterias toxigénicas dentro de una misma floración que contiene simultáneamente varias de las cianotoxinas más extendidas (Casero et al., 2019). Dichas mezclas de cianotoxinas son comunes en el agua dulce y podrían tener efectos antagonistas y sinérgicos en los organismos (Christensen et al., 2021). El riesgo potencial de muchos metabolitos de cianobacterias sigue siendo en su mayoría desconocido (Janssen, 2019). Solo las MCs, una clase de cianopéptidos hepatotóxicas, se han estudiado intensamente, al ser las más comunes y considerarse uno de los grupos más peligrosos (Kaur, 2019). Entre los congéneres de MCs, predominan la MC-LR siendo la más tóxica y abundante, seguida de la MC-RR y la MC-YR (Li et al., 2017). Una familia de compuestos cíclicos heptapéptidos conformados por una estructura común de 5 aminoácidos fijos y otros 2 cambiantes, los cuales caracterizan a cada variante. Hasta el momento, más de 100 variantes de estructura han sido caracterizadas y se nombran según los aminoácidos incorporados en las posiciones 2 y 4; la MC-LR, por ejemplo, contiene leucina (L) en la posición 2 y arginina (R) en la posición 4. De manera que, gracias a su estructura péptida cíclica las MCs son muy estables y resistentes, y en efecto se ha evidenciado la persistencia de estas toxinas cianobacterianas en el ecosistema acuático, por lo que los procesos de tratamiento de agua convencionales no pueden eliminarlas eficientemente (Dehghani, 2016). Por ello, representan un riesgo para la calidad del agua y se hace necesario la búsqueda de alternativas, tales como la aplicación de ultrasonido, para la degradación de cianotoxinas.

7.2. METODOLOGÍA

Para la identificación y cuantificación de las cianotoxinas se utilizaron técnicas analíticas avanzadas, haciendo uso de un cromatógrafo líquido ACQUITY UPLC H-Class acoplado a espectrometría de masas con triple cuadrupolo Xevo TQD (UPLC/MS/MS, por sus siglas en inglés) (Waters, EE.UU.) (ver Figura 28), previo a la preparación de las muestras por medio de la extracción y concentración del analito de interés, a través de la técnica de extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés). Lo anterior, con base en el protocolo interno del grupo GDCON (GE-PA-089-GDCON v03) (EPA/600/R-17/344). Toda la experimentación se realizó a temperatura ambiente 20 ±2°C.



Figura 28. Equipo UHPLC/MS/MS.

Dado que se trabajó con matriz natural, y se desconocía la concentración de cianotoxinas en el agua, se optó por someter las muestras, previamente, a un proceso de 3 ciclos de congelado-descongelado, con el fin de provocar la ruptura celular, obteniendo la mayor cantidad posible de toxinas extracelulares, y de esta forma poder evidenciar porcentajes de degradación significativos, teniendo en cuenta que el límite de cuantificación (LC) del análisis cromatográfico es de 0,1 µg/L. Adicionalmente, fue necesaria la filtración de cada una de las muestras, debido al alto contenido de biomasa algal (ver Figura 29), para lo cual se empleó filtros de fibra de vidrio con un tamaño de poro de 0,45 µm. Cabe resaltar que el proceso de sonicación se realizó en la matriz natural sin filtrar. La filtración se realizó posteriormente para poder llevar a cabo el proceso SPE.

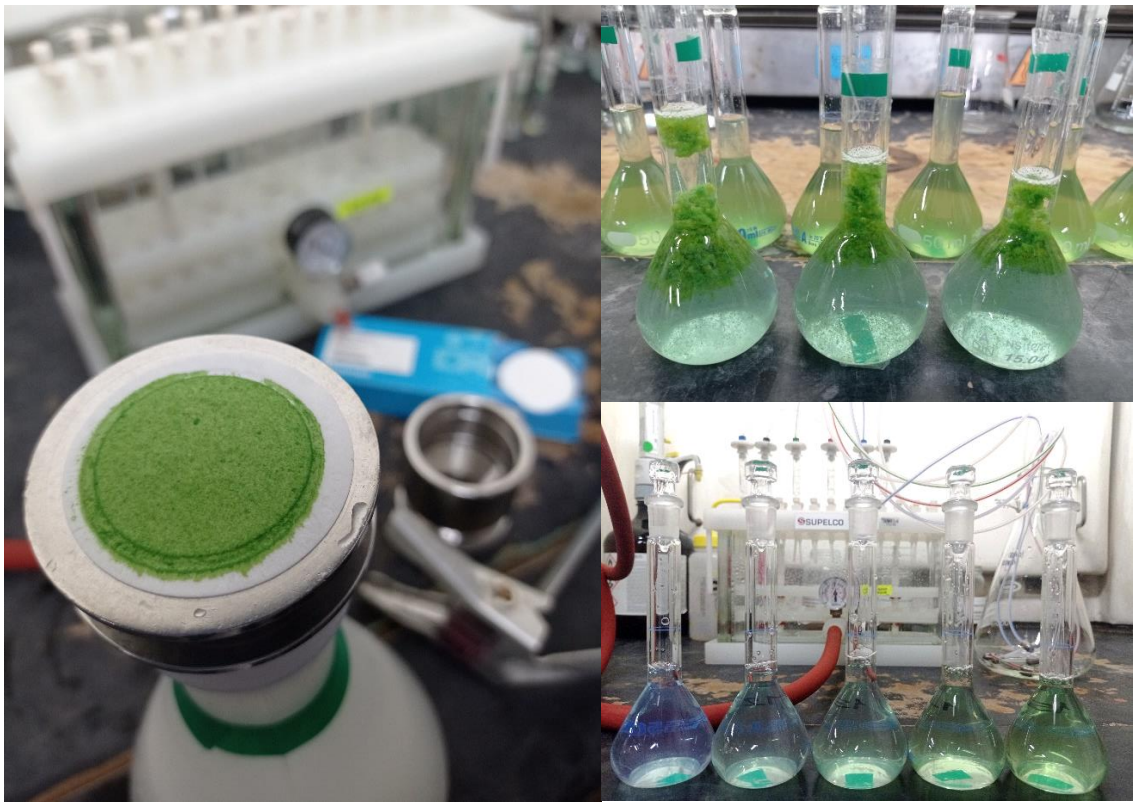


Figura 29. Proceso de filtración de las muestras.

7.2.1. Reactivos

Todos los productos químicos y reactivos utilizados fueron de grado analítico y las soluciones se prepararon con agua ultrapura mediante un sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore Pty Ltd, EE. UU.). Para el SPE se usó metanol (CH_3OH) grado HPLC (pureza ≥ 99,8%). Adicionalmente, para la cuantificación en el cromatógrafo líquido de alta eficiencia se utilizó formiato de amonio (NH_4HCO_2) sólido grado análisis (pureza > 99,9%), argón (Ar) y nitrógeno gaseoso (N_2) ultrapuro, además de estándares certificados de cianotoxinas (MC-LR, MC-RR, MC-YR y NOD) (pureza > 95%) provenientes de Eurofins Abraxis (Warminster, EE.UU.).

7.2.2. Extracción y concentración

Posteriormente, las muestras fueron sometidas a SPE (ver Figura 30), para ello, se utilizaron cartuchos de extracción Oasis HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) (Waters, EE.UU.) de 60 mg/3 mL. Antes de iniciar el proceso, se lavaron las mangueras del manifold con el uso de jeringas, haciendo pasar solución agua-metanol 90:10, para eliminar posibles interferencias. El cartucho es acondicionado por enjuague y sin dejar secar, con 10 mL de metanol grado HPLC, por medio de un suave goteo a través del manifold, seguido de 10 mL de agua ultrapura. Luego, cada muestra de agua previamente filtrada y contenida en balones volumétricos de 50 mL, es introducida bajo vacío, a través del cartucho acondicionado a una velocidad de flujo de 5 mL/min. A continuación, los analitos son eluidos con 10 mL de metanol grado HPLC, a viales de 25 mL. Adicionalmente, se seca la muestra utilizando un flujo suave de aire (O_2) durante aproximadamente 2 h en observación constante, hasta obtener un volumen reducido de 1 mL aproximadamente. Este es llevado a un balón volumétrico de 5 mL, lavando el vial con pequeñas

cantidades de solución metanol-agua 90:10 y aforando con esta misma solución. Por último, la solución es llevada a un vial ámbar de 2 mL con tapa de septa ranurada certificado para UPLC. De esta forma se obtiene un factor de concentración de 10. Como control analítico, se usó un blanco, un control de 1 y/o 5 µg/L, una muestra enriquecida y una réplica de esta, por cada lote de 20 muestras, siguiendo los requerimientos del Sistema de Gestión de Calidad del grupo GDCON.

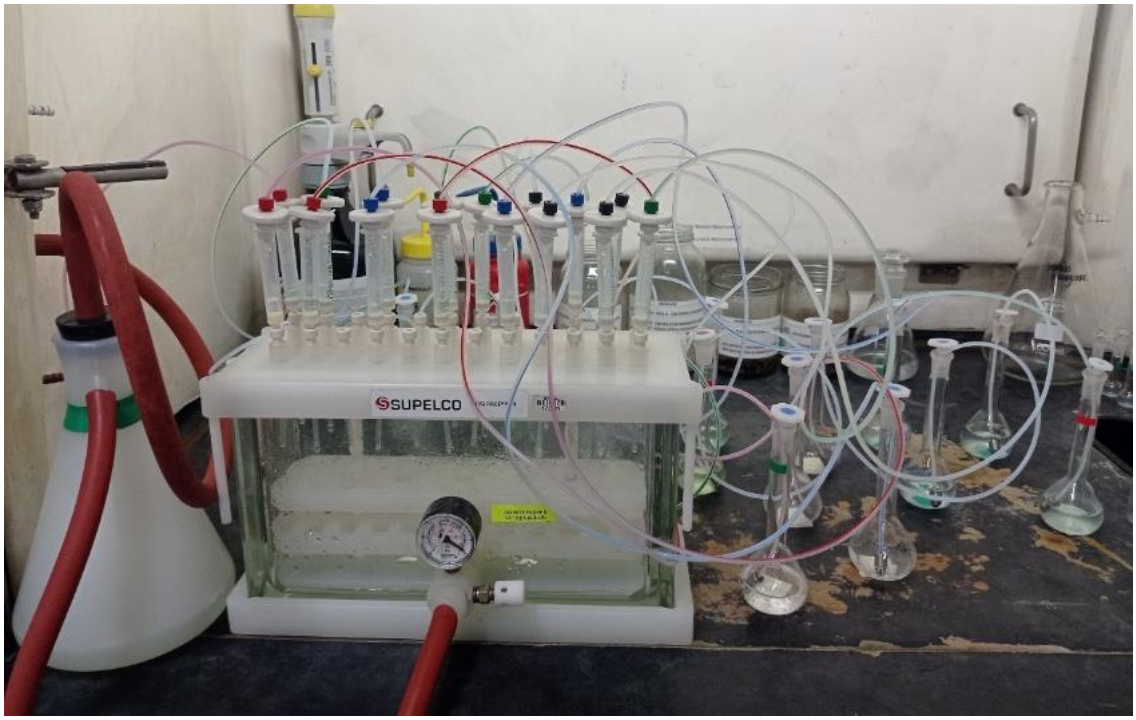


Figura 30. Montaje del proceso SPE.

7.2.3. Identificación y cuantificación

Finalmente, se inyectaron 30 µL de muestra en el equipo. Para la separación de los analitos se utilizó una columna de separación kinetex C18, 1,7 µm de tamaño de partícula, 2,1 mm x 50 mm.

Las condiciones de operación del equipo de UPLC fueron las siguientes:

- Temperatura de la columna: 30 °C
- Flujo: 0,25 mL/min
- Tiempo de corrido: 10 min
- Temperatura de las muestras (viales): 15 °C
- Fase móvil acuosa: agua-metanol 95:5, 5mM formiato de amonio
- Fase móvil orgánica: metanol-agua 95:5, 5mM formiato de amonio

Por otro lado, las condiciones de operación para el espectrómetro de masas fueron las siguientes:

- Temperatura de la fuente: 150 °C
- Temperatura de desolvatación: 350 °C
- Flujo de gas de desolvatación (N_2): 650 L/h
- Flujo de gas del cono (N_2): 50 L/h
- Ionización: ESI (+)

- Voltaje de capilaridad: 3,5 kv

La curva de calibración se realizó para cada cianotoxina. El rango de trabajo fue de 1-50 µg/L (1, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 µg/L). Para preparar las soluciones estándar, se empleó una mezcla de cianotoxinas de 200 µg/L en metanol grado HPLC. El LC se determinó como el menor valor al que se le calculó precisión y exactitud, en este caso 1 µg/L. Así, el menor valor cuantificado en las muestras con un factor de concentración de 10, es 0,1 µg/L. Los valores detectados en las muestras por debajo a este valor, son reportados como menor al LC (<LC). Las muestras fueron cuantificadas con las regresiones lineales obtenidas de cada curva de calibración.

7.3. RESULTADOS

En total, se analizaron cuatro cianotoxinas: tres variantes de microcistina (MC-LR, MC-RR, MC-YR) y nodularina (NOD), todas ellas hepatotoxinas. En la muestra previa de noviembre de 2021 (ver Tabla 8) se detectó la presencia de MCs, a excepción de MC-YR; sin embargo, en el muestreo realizado en septiembre de 2022 (ver Tabla 9), se detectaron las tres variantes de MCs en altas concentraciones. En ninguno de los dos casos se detectó presencia de NOD. A partir de esta última muestra se llevaron a cabo los ensayos de sonicación. En general, las concentraciones de MC-LR, fueron considerablemente mayores que las demás MCs. Específicamente, en orden de magnitud la concentración de cianotoxinas fue MC-LR>MC-RR>MC-YR, alcanzando un valor por encima 6 mg/L de MC-LR. Las demás MCs, se hallaron en concentraciones mucho menores, por debajo de 1 mg/L.

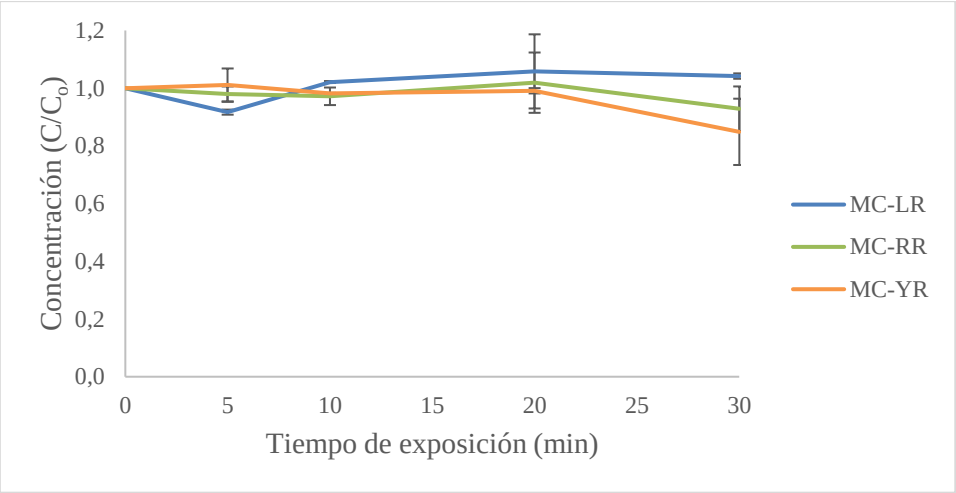
Tabla 8. *Concentración de cianotoxinas en el embalse Porce II, 26-11-2021*.

Punto de muestreo		CIANOTOXINAS µg/L			
		MC-LR	**MC-RR**	**MC-YR**	**NOD**
Embalse Porce II	**ZF**	11,97	1,44	<LC	<LC

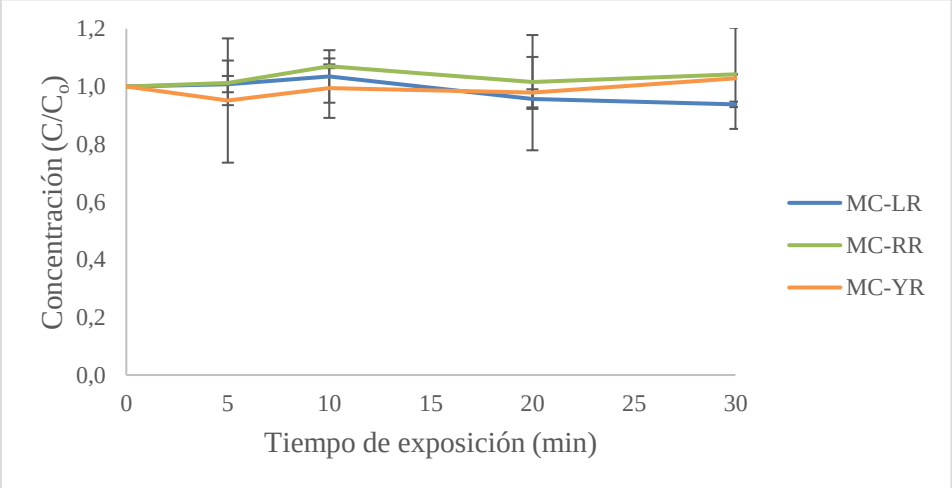
Tabla 9. *Concentración de cianotoxinas en el embalse Porce II, 02-09-2022.*

Punto de muestreo		CIANOTOXINAS µg/L			
		MC-LR	**MC-RR**	**MC-YR**	**NOD**
Embalse Porce II	**ZF**	6.773,66	118,84	4,27	<LC

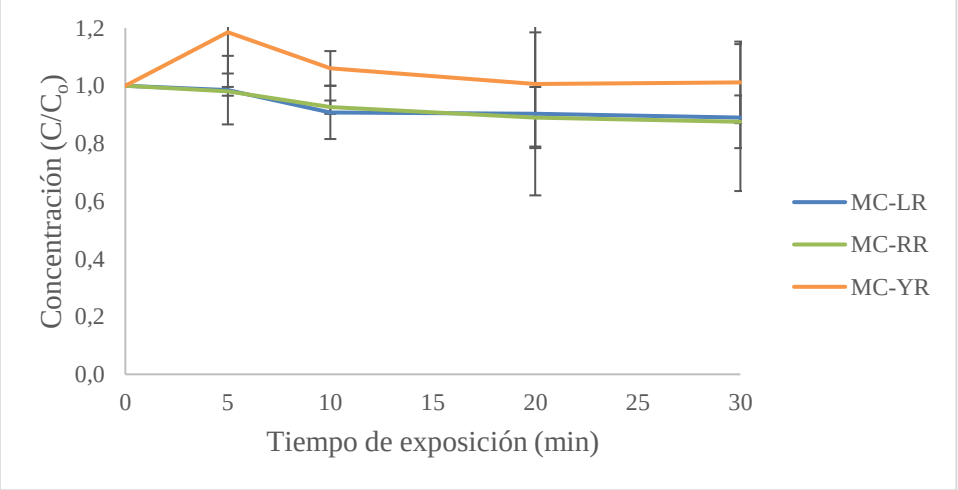
En las Gráficas 6, 7 y 8, se observa los resultados obtenidos en cuanto a la degradación de cianotoxinas presentes en el agua, tras los ensayos de sonicación, sin embargo, no se lograron porcentajes de degradación significativos. En efecto, al usar muestras naturales, la concentración inicial de las cianotoxinas varió para cada ensayo, por lo que se presentan los valores normalizados para facilitar su interpretación. Adicionalmente, a pesar de que los ensayos se hicieron por triplicado, fue necesario omitir los valores atípicos observados en el primer corrido, ya que en un inicio no se filtraron las muestras previamente al proceso de SPE, lo que no permitió una adecuada extracción y concentración del analito, observándose valores muy lejanos de la media en comparación con los otros dos corridos.



Gráfica 6. Degradación de cianotoxinas bajo la potencia mínima (10 W) a 40 kHz.



Gráfica 7. Degradación de cianotoxinas bajo la potencia media (30 W) a 40 kHz.



Gráfica 8. Degradación de cianotoxinas bajo la potencia máxima (50 W) a 40 kHz.

Se evidencia, además, que en ocasiones las concentraciones de las cianotoxinas aumentan con respecto a la concentración inicial, lo cual podría deberse a que ciertas células lograron permanecer intactas tras el ciclo de congelado-descongelado y haberse producido la lisis celular durante el proceso de sonicación, y solo hasta entonces, darse la liberación de las cianotoxinas intracelulares. Sin embargo, en los ensayos bajo la potencia máxima de 50 W se observa una ligera disminución, cerca de un 10% aproximadamente, en la concentración de MCs.

7.4. DISCUSIÓN

A través de diferentes estudios en los últimos años, se ha demostrado que la aplicación de ultrasonido es eficaz para la eliminación de cianotoxinas, como las MCs producidas por *Microcystis aeruginosa* (Park et al., 2017). Sin embargo, tal como se ha mencionado, la efectividad del proceso de sonicación estará dada por el ajuste de parámetros operativos tales como la frecuencia, la intensidad (o potencia) y la duración de la exposición a las ondas de ultrasonido (Rajasekhar et al., 2012a). En este sentido, Ma et al. (2005) probaron varias frecuencias (20, 150, 410 kHz a una intensidad constante de 30 W) obteniendo una reducción de las MCs en un 70,6% y 65,2% a 150 y 410 kHz, luego de 20 min de sonicación. No obstante, al evaluar el efecto de las intensidades de potencia (30, 60 y 90 W a una frecuencia constante de 20 kHz), se degradaron el 18,1%, 50,2% y 63,6% de las MCs, respectivamente, luego de 20 min de sonicación. Lo que indica que las frecuencias intermedias produjeron una eficiencia relativamente mejor en cuanto a la degradación de las MCs, mientras que a baja frecuencia fue necesario aumentar las potencias de sonicación con el fin de obtener una tasa de degradación considerable (Ma et al., 2005). En este sentido, la tasa de eliminación se acelera con el aumento de la intensidad ultrasónica.

En el presente estudio, a pesar de que se trabajó con un rango de frecuencia y potencias muy similares (10, 30 y 50 W a una frecuencia fija de 40 kHz), no se obtuvieron porcentajes de degradación tan significativos como Ma et al. (2005). Lo cual sugiere, que las elevadas concentraciones de cianotoxinas en el agua, según lo planteado por Chen et al. (2020), influye en gran medida en la eficiencia de degradación. De este modo, al evaluar el efecto de la concentración inicial sobre la degradación de MCs (3,21, 21,51 y 136,25 μg/L), obtuvieron menores porcentajes de remoción a medida que se aumentaba la concentración inicial de cianotoxinas, esto incluso empleando una potencia de hasta 1.200 W y una concentración máxima de 136,25 μg/L (cerca de 70% en 15 min) (Chen et al., 2020). Cabe destacar que, en nuestro caso, aunque los ensayos llevados a cabo tuvieron concentraciones iniciales diferentes al tratarse de una matriz natural, cada una de las muestras partió de concentraciones considerablemente mayores, desde una concentración mínima de 925,41 μg/L, hasta una concentración máxima de 2.595,42 μg/L para MC-LR. Adicionalmente, Chen et al. (2020) también señalaron que la tasa de eliminación de MCs puede alcanzar su máximo en poco tiempo, y luego tiende a ser estable (Chen et al., 2020). De este modo, alcanzaron una tasa de eliminación del 81% de MCs, en tan solo 5 min, partiendo de una concentración de 12,43 μg/L bajo una potencia de 1.200 W; y logrando eliminar casi por completo las MCs, hasta un 99%, después de 15 min. Por lo tanto, las MCs pueden ser degradadas rápidamente bajo tratamiento con ultrasonido dependiendo de su concentración en el agua.

Por otro lado, es importante destacar que, aunque las cianotoxinas en su mayoría están confinadas al interior de las células, estas finalmente se liberan en el agua tras la muerte celular, ya sea natural

o artificialmente inducida. Así mismo, la turbulencia en los cuerpos de agua puede llegar a aumentar la producción y liberación de cianotoxinas (Zhou et al., 2016), incrementando el riesgo de exposición a MCs durante los períodos de floración de cianobacterias. En consecuencia, es posible encontrar concentraciones elevadas de cianotoxinas en ambientes acuáticos, debido al efecto de factores bióticos y abióticos. Tal y como se evidenció en el embalse Porce II, cuyas concentraciones alcanzaron magnitudes incluso de mg/L, en lugar de µg/L como es recurrente. Por lo tanto, es importante que el proceso de sonicación propenda no acrecentar la liberación de toxinas en el ambiente. Es por esto que Zhang et al. (2006a) recomendaron el uso de una potencia ultrasónica inferior a 48 W a una frecuencia de 80 kHz, al encontrar que una mayor potencia bajo una irradiación prolongada causaron un efecto no deseado, en cuanto a la liberación de MCs que aumentaron significativamente las concentraciones extracelulares (Zhang, et al., 2006a). Así mismo, Ma et al. (2005) indicaron que la irradiación ultrasónica de menos de 5 min podría no introducir el aumento de MCs disueltas (Ma et al., 2005).

Adicionalmente, las concentraciones de cianotoxinas en el agua tienen una variación significativa espacio-temporal, y los episodios de picos de altas concentraciones pueden perderse en el esquema de monitoreo tradicional. Esto se evidenció, en las campañas de muestreo realizadas, al encontrar concentraciones de MCs muchísimo más bajas durante el premuestreo, en comparación con las concentraciones detectadas meses después, que probablemente pudieron disiparse en el volumen de agua por acción del viento y las lluvias. De este modo, Caly et al. (2022) detectaron la presencia de cianotoxinas en al menos seis de las siete estaciones monitoreadas en las diferentes campañas de muestreo, aunque en concentraciones mínimas, que no superaron el valor guía establecido por la OMS de 1 µg/L de MC-LR (Caly et al., 2022); no obstante, es necesario incorporar alternativas sensibles y representativas, que permitan la detección de cianotoxinas incluso en concentraciones traza (Wang et al., 2022). Así mismo, un aumento de las frecuencias de muestreo o la instalación de sistemas de muestreo automático podrían proporcionar una solución; si bien, esto a menudo puede ser complicado, especialmente en áreas remotas (Kohoutek et al., 2008).

Bajo este escenario, se hace necesaria la incorporación de programas de monitoreo y control en los diferentes embalses de la región. De esta manera, para la mayoría de los productos químicos presentes en el agua, incluidas las cianotoxinas, se establece una dosis umbral (WHO, 2011), es decir, un nivel de exposición por debajo del cual no se observan efectos nocivos, sin embargo, a concentraciones tan elevadas como las detectadas en septiembre de 2022, de hasta 6,77 mg/L de MC-LR, aumenta la posibilidad de presentarse episodios de intoxicaciones letales o graves después de una exposición aguda o a corto plazo, tanto en humanos como animales. Lo cual merece mayor atención, más aún cuando estudios recientes han identificado que los contaminantes del agua pueden llegar a aumentar la toxicidad, en comparación con los efectos de la toxina pura (Pamplona-Silva et al., 2018). Incluso valores reportados como un nuevo récord en otros países, no alcanzan la dimensión de las concentraciones halladas en el presente estudio; Pavlova et al. (2014) hicieron un llamado a las autoridades responsables, al registrar concentraciones de MCs entre 0,1 y 26,5 µg/L en cinco cuerpos de agua búlgaros (Pavlova et al., 2014). Una invitación a que los entes reguladores se pronuncien en cuanto a la prioridad de establecer una normatividad a nivel nacional y poder ejercer la respectiva vigilancia y control.

7.5. CONCLUSIONES

En total se analizaron cuatro hepatotoxinas: MC-LR, MC-RR, MC-YR y NOD. En el embalse Porce II se detectaron las tres variantes de MCs en altas concentraciones. Por el contrario, NOD registró <LC en ambas campañas de muestreo. En orden de magnitud la concentración de cianotoxinas fue MC-LR>MC-RR>MC-YR. Particularmente, MC-LR se encontró en concentraciones considerablemente mayores que las demás MCs. No obstante, todas ellas superaron el valor guía recomendado por la OMS de 1 µg/L para MC-LR, alcanzando un valor de hasta 6,77 mg/L. En este sentido, merece mayor atención la evaluación de riesgos y los esfuerzos de mitigación de florecimientos de cianobacterias en embalses, considerando el peligro potencial de exposición a cianotoxinas, independientemente de su uso. Adicionalmente, se evidenció una notable diferencia en las concentraciones de cianotoxinas en el agua entre campañas de muestreo, por lo que posiblemente los episodios de picos de altas concentraciones pueden perderse en el esquema de monitoreo tradicional, al tener una variación significativa espacio-temporal.

En cuanto a los ensayos de sonicación, no se obtuvieron tasas de degradación significativas luego de 30 min de tratamiento, lo que indica que a concentraciones tan elevadas de MCs, de hasta 2.595,42 µg/L para MC-LR, no es suficiente el uso de potencias en el rango de 10-50 W bajo una frecuencia de 40 kHz, por lo cual, se hace necesario un aumento en la intensidad ultrasónica en consideración a la concentración inicial de cianotoxinas, con el fin de obtener porcentajes de degradación mucho mayores. Sin embargo, para aplicaciones en campo debe tenerse en cuenta, así mismo, su efecto sobre las células cianobacterianas y la liberación de cianotoxinas al medio acuático. De este modo, aunque se ha demostrado en los últimos años que la aplicación de ultrasonido es eficaz para la eliminación de cianotoxinas, como las MCs, la efectividad del proceso de sonicación estará dada por el ajuste de parámetros operativos tales como la frecuencia, la intensidad (o potencia) y la duración de la exposición a las ondas de ultrasonido.

8. REFERENCIAS

Acuña-Alonso, C., Álvarez, X., Lorenzo, O., Cancela, Á., Valero, E., & Sánchez, Á. (2020). Assessment of water quality in eutrophized water bodies through the application of indexes and toxicity. *Science of the Total Environment*, *728*, 138775. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138775

Aguilera, A., Klemenčič, M., Sueldo, D. J., Rzymski, P., Giannuzzi, L., & Martin, M. V. (2021). Cell Death in Cyanobacteria: Current Understanding and Recommendations for a Consensus on Its Nomenclature. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 631654. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.631654

Aguirre Ramírez, N. J. (2013). *Hidrobiología Sanitaria*. Universidad de Antioquia.

Aguirre Ramírez, N. J., & Caicedo Quintero, O. (2013). *Métodos de campo y laboratorio para Hidrobiología Sanitaria*. Universidad de Antioquia.

Ahn, C. Y., Park, M. H., Joung, S. H., Kim, H. S., Jang, K. Y., & Oh, H. M. (2003). Growth inhibition of cyanobacteria by ultrasonic radiation: Laboratory and enclosure studies. *Environmental Science and Technology*, *37*(13), 3031–3037. https://doi.org/10.1021/es034048z

Alvarez Dalinger, F. S., Lozano, V. L., Borja, C. N., Moraña, L. B., & María Mónica, S. (2023). Short-Term Meteorological Conditions Explain Cyanobacterial Blooms in a Tropical Reservoir. *Water*, *15*(2), 302. https://doi.org/10.3390/w15020302

Baker, J. A., Entsch, B., Neilan, B. A., & McKay, D. B. (2002). Monitoring changing toxigenicity of a cyanobacterial bloom by molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(12), 6070–6076. https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6070-6076.2002

Barçante, B., Nascimento, N. O., Silva, T. F. G., Reis, L. A., & Giani, A. (2020). Cyanobacteria dynamics and phytoplankton species richness as a measure of waterbody recovery: Response to phosphorus removal treatment in a tropical eutrophic reservoir. *Ecological Indicators*, *117*, 106702. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106702

Barnett, A., & Beisner, B. E. (2007). Zooplankton biodiversity and lake trophic state: Explanations invoking resource abundance and distribution. *Ecology*, *88*(7), 1675–1686. https://doi.org/10.1890/06-1056.1

Bláha, L., Babica, P., & Maršálek, B. (2009). Toxins produced in cyanobacterial water blooms - toxicity and risks. *Interdisciplinary Toxicology*, *2*(2), 36–41. https://doi.org/10.2478/v10102-009-0006-2

Brasil, J., Attayde, J. L., Vasconcelos, F. R., Dantas, D. D. F., & Huszar, V. L. M. (2016). Drought-induced water-level reduction favors cyanobacteria blooms in tropical shallow lakes. *Hydrobiologia*, *770*(1), 145–164. https://doi.org/10.1007/s10750-015-2578-5

Brooks, B. W., Lazorchak, J. M., Howard, M. D. A., Johnson, M. V. V., Morton, S. L., Perkins, D. A. K., Reavie, E. D., Scott, G. I., Smith, S. A., & Steevens, J. A. (2016). Are harmful algal blooms becoming the greatest inland water quality threat to public health and aquatic ecosystems? *Environmental Toxicology and Chemistry*, *35*(1), 6–13. https://doi.org/10.1002/etc.3220

Buratti, F. M., Manganelli, M., Vichi, S., Stefanelli, M., Scardala, S., Testai, E., & Funari, E. (2017). Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Archives of Toxicology*, *91*(3), 1049–1130. https://doi.org/10.1007/s00204-016-1913-6

Burford, M. A., Carey, C. C., Hamilton, D. P., Huisman, J., Paerl, H. W., Wood, S. A., & Wulff, A. (2020). Perspective: Advancing the research agenda for improving understanding of cyanobacteria in a future of global change. *Harmful Algae*, *91*, 101601. https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.04.004

Caly, L. F., Rodríguez, D. C., & Peñuela, G. A. (2022). Monitoring of cyanobacteria and cyanotoxins in a Colombian tropical reservoir. *Environmental Science and Pollution Research*, *29*(35), 52775–52787. https://doi.org/10.1007/s11356-022-19216-9

Caramés, D. M. M. (2016). Tecnologías de control de floraciones de cianobacterias y algas nocivas en cuerpos de agua, con énfasis en el uso de irradiación por ultrasonido. *Innotec*, *12*(12), 54–61. http://ojs.latu.org.uy/index.php/INNOTEC/article/view/367

Carmichael, W. W. (2001). Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria: "The CyanoHABs." *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, *7*(5), 1393–1407. https://doi.org/10.1080/20018091095087

Casero, M. C., Velázquez, D., Medina-Cobo, M., Quesada, A., & Cirés, S. (2019). Unmasking the identity of toxigenic cyanobacteria driving a multi-toxin bloom by high-throughput sequencing of cyanotoxins genes and 16S rRNA metabarcoding. *Science of the Total Environment*, *665*, 367–378. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.083

Chen, G., Ding, X., & Zhou, W. (2020). Study on ultrasonic treatment for degradation of Microcystins (MCs). *Ultrasonics Sonochemistry*, *63*, 104900. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104900

Chen, L., Giesy, J. P., & Xie, P. (2018). The dose makes the poison. *Science of the Total Environment*, *621*,

649–653. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.218
Choi, J. S., Park, Y. H., Kim, S., Son, J., Park, J., & Choi, Y. E. (2022). Strategies to control the growth of cyanobacteria and recovery using adsorption and desorption. *Bioresource Technology*, *365*, 128133. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128133
Chorus, I., & Bartram, J. (1999). *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management* (E & FN Spon (ed.); Vol. 73).
Christensen, V. G., Stelzer, E. A., Eikenberry, B. C., Olds, H. T., LeDuc, J. F., Maki, R. P., Saley, A. M., Norland, J., & Khan, E. (2021). Cyanotoxin mixture models: Relating environmental variables and toxin co-occurrence to human exposure risk. *Journal of Hazardous Materials*, *415*, 125560. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125560
Cobo, F. (2015). Métodos de control de las floraciones de cianobacterias en agues continentales. *Limnetica*, *34*(1), 247–268. http://www.limnetica.net/Limnetica/Limne34/L34a247_Control_cianobacterias_aguas_continentales.pdf
Crettaz-Minaglia, M., Sedan, D., & Giannuzzi, L. (2017). Bioacumulacion y biomagnificacion de cianotoxinas en organismos acuaticos de agua dulce. In *Cianobacterias como determinantes ambientales de la salud* (pp. 171–186). Ministerio de Salud de la Nación, departamento de Salud Ambiental. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/72653/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
Dalu, T., & Wasserman, R. J. (2018). Cyanobacteria dynamics in a small tropical reservoir: Understanding spatio-temporal variability and influence of environmental variables. *Science of the Total Environment*, *643*, 835–841. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.256
Davis, T. W., Berry, D. L., Boyer, G. L., & Gobler, C. J. (2009). The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of Microcystis during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae*, *8*(5), 715–725. https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.02.004
Davis, T. W., Harke, M. J., Marcoval, M. A., Goleski, J., Orano-Dawson, C., Berry, D. L., & Gobler, C. J. (2010). Effects of nitrogenous compounds and phosphorus on the growth of toxic and non-toxic strains of Microcystis during cyanobacterial blooms. *Aquatic Microbial Ecology*, *61*(2), 149–162. https://doi.org/10.3354/ame01445
Davis, T. W., Stumpf, R., Bullerjahn, G. S., McKay, R. M. L., Chaffin, J. D., Bridgeman, T. B., & Winslow, C. (2019). Science meets policy: A framework for determining impairment designation criteria for large waterbodies affected by cyanobacterial harmful algal blooms. *Harmful Algae*, *81*, 59–64. https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.11.016
Dehghani, M. H. (2016). Removal of cyanobacterial and algal cells from water by ultrasonic waves — A review. *Journal of Molecular Liquids*, *222*, 1109–1114. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.08.010
Den Uyl, P. A., Harrison, S. B., Godwin, C. M., Rowe, M. D., Strickler, J. R., & Vanderploeg, H. A. (2021). Comparative analysis of Microcystis buoyancy in western Lake Erie and Saginaw Bay of Lake Huron. *Harmful Algae*, *108*, 102102. https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.102102
Domitrovic, Y. Z. De, & Forastier, M. E. (2005). Biodiversidad de Cyanophyceae (Cyanobacteria) y especies toxigénicas del litoral fluvial argentino. *Miscelánea*, *14*, 213–228.
EPM. (2023). *Centrales hidroeléctricas EPM*. https://cu.epm.com.co/institucional/sobre-epm/nuestras-plantas/plantas-de-energia/centrales-hidroelectricas-epm#Menores-acueducto-Pertenecen-a-acueducto-pero-son-operadas-y-mantenidas-por-generaci-n-517
Fan, J., Ho, L., Hobson, P., & Brookes, J. (2013). Evaluating the effectiveness of copper sulphate, chlorine, potassium permanganate, hydrogen peroxide and ozone on cyanobacterial cell integrity. *Water Research*, *47*(14), 5153–5164. https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.057
Feng, Y., Chen, X., Ding, W., Ma, J., Zhang, B., & Li, X. (2020). MicroRNA-16 participates in the cell cycle alteration of HepG2 cells induced by MC-LR. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *192*, 110295. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110295
Franklin, D. J. (2021). Examining the Evidence for Regulated and Programmed Cell Death in Cyanobacteria. How Significant Are Different Forms of Cell Death in Cyanobacteria Population Dynamics? *Frontiers in Microbiology*, *12*, 633954. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.633954
Gaget, V., Lau, M., Sendall, B., Froscio, S., & Humpage, A. R. (2017). Cyanotoxins: Which detection technique for an optimum risk assessment? *Water Research*, *118*, 227–238. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.025
Galizia Tundisi, J. (2018). Reservoirs: New challenges for ecosystem studies and environmental management. *Water Security*, *4–5*, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.wasec.2018.09.001
García-Chicote, J. (2015). *El zooplancton como indicador de la calidad del agua en embalses. Un estudio en el ámbito de actuación de la Confederación Hidrográfica del Júcar.* nstitut Cavanilles de

Biodiversitat i Biologia Evolutiva Universitat de València.
Gaysina, L. A., Saraf, A., & Singh, P. (2019). Cyanobacteria in diverse habitats. In *Cyanobacteria: From Basic Science to Applications* (pp. 1–28). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00001-5
Glibert, P. M. (2020). Harmful algae at the complex nexus of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*, *91*, 101583. https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.03.001
Gmitrowicz-Iwan, J., Ligęza, S., Pranagal, J., Smal, H., & Olenderek, H. (2020). Small floodplain reservoirs in the face of climate change—sink or source of nutrients? *Water*, *12*(12), 3423. https://doi.org/10.3390/w12123423
Gobler, C. J. (2020). Climate Change and Harmful Algal Blooms: Insights and perspective. *Harmful Algae*, *91*, 101731. https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101731
Gobler, C. J., Burkholder, J. A. M., Davis, T. W., Harke, M. J., Johengen, T., Stow, C. A., & Van de Waal, D. B. (2016). The dual role of nitrogen supply in controlling the growth and toxicity of cyanobacterial blooms. *Harmful Algae*, *54*, 87–97. https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.01.010
González Hernández, D. A. (2021). *Planteamiento de estrategias de prevención, control y mitigación de los problemas ambientales generados por las cianobacterias en el embalse de la hidroeléctrica de Ituango* [Universidad de Antioquia]. https://bibliotecadigital.udea.edu.co/handle/10495/22451
Grattan, L. M., Holobaugh, S., & Morris, J. G. (2016). Harmful algal blooms and public health. *Harmful Algae*, *57*, 2–8. https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.05.003
Greenstein, K. E., Zamyadi, A., & Wert, E. C. (2021). Comparative assessment of physical and chemical cyanobacteria cell lysis methods for total microcystin-LR analysis. *Toxins*, *13*(9), 596.
He, X., Liu, Y. L., Conklin, A., Westrick, J., Weavers, L. K., Dionysiou, D. D., Lenhart, J. J., Mouser, P. J., Szlag, D., & Walker, H. W. (2016). Toxic cyanobacteria and drinking water: Impacts, detection, and treatment. *Harmful Algae*, *54*, 174–193. https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.01.001
Hou, X., Feng, L., Dai, Y., Hu, C., Gibson, L., Tang, J., Lee, Z., Wang, Y., Cai, X., Liu, J., Zheng, Y., & Zheng, C. (2022). Global mapping reveals increase in lacustrine algal blooms over the past decade. *Nature Geoscience*, *15*(2), 130–134. https://doi.org/10.1038/s41561-021-00887-x
Hu, C., & Rzymski, P. (2019). Programmed cell death-like and accompanying release of microcystin in freshwater bloom-forming cyanobacterium microcystis: From identification to ecological relevance. *Toxins*, *11*(12), 1–19. https://doi.org/10.3390/toxins11120706
Huang, Y. R., Li, H. Z., Wei, X. M., Wang, D. H., Liu, Y. T., & Li, L. (2020). The effect of low frequency ultrasonic treatment on the release of extracellular organic matter of Microcystis aeruginosa. *Chemical Engineering Journal*, *383*, 123141. https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123141
Huisman, J., Codd, G. A., Paerl, H. W., Ibelings, B. W., Verspagen, J. M. H., & Visser, P. M. (2018). Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(8), 471–483. https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1
ICONTEC. (2016). NTC-ISO 5667-4 Gestión ambiental. Calidad del agua. Muestreo. Guía para el muestreo de lagos naturales y artificiales. In *Norma Técnica Colombiana*.
ICONTEC. (2018). NTC-ISO 5667-3 Calidad del agua. Muestreo. Directrices para la preservación y manejo de las muestras. In *Norma Tecnica Colombiana*.
ICONTEC. (2020). NTC-ISO 5667-2 Gestión ambiental. Calidad del agua. Muestreo. Técnicas generales de muestreo. In *Norma Técnica Colombiana*.
IDEAM, & INVEMAR. (2017). *Protocolo de Monitoreo del Agua - Colombia*. http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/023773/PROTOCOLO_MONITOREO_AGUA_IDEAM.pdf
INS. (2011). *Manual de instrucciones para la toma, preservación y transporte de muestras de agua de consumo humano para análisis de laboratorio*.
Jacinavicius, F. R., Pacheco, A. B. F., Chow, F., Verissimo da Costa, G. C., Kalume, D. E., Rigonato, J., Schmidt, E. C., & Sant'Anna, C. L. (2019). Different ecophysiological and structural strategies of toxic and non-toxic Microcystis aeruginosa (cyanobacteria) strains assessed under culture conditions. *Algal Research*, *41*, 101548. https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101548
Jančula, D., Mikula, P., Maršálek, B., Rudolf, P., & Pochylý, F. (2014). Selective method for cyanobacterial bloom removal: Hydraulic jet cavitation experience. *Aquaculture International*, *22*(2), 509–521. https://doi.org/10.1007/s10499-013-9660-7
Janssen, E. M. L. (2019). Cyanobacterial peptides beyond microcystins – A review on co-occurrence, toxicity, and challenges for risk assessment. *Water Research*, *151*, 488–499. https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.048
Joyce, E. M., Wu, X., & Mason, T. J. (2010). Effect of ultrasonic frequency and power on algae suspensions. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and*

Environmental Engineering, *45*(7), 863–866. https://doi.org/10.1080/10934521003709065
Kamp, L., Church, J. L., Carpino, J., Faltin-Mara, E., & Rubio, F. (2016). The effects of water sample treatment, preparation, and storage prior to cyanotoxin analysis for cylindrospermopsin, microcystin and saxitoxin. *Chemico-Biological Interactions*, *246*, 45–51. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.12.016
Kaur, G. (2019). Freshwater Cyanotoxins. In *Biomarkers in Toxicology* (pp. 601–613). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814655-2.00035-9
Khatri, N., & Tyagi, S. (2015). Influences of natural and anthropogenic factors on surface and groundwater quality in rural and urban areas. *Frontiers in Life Science*, *8*(1), 23–39. https://doi.org/10.1080/21553769.2014.933716
Kohoutek, J., Babica, P., Bláha, L., & Maršálek, B. (2008). A novel approach for monitoring of cyanobacterial toxins: Development and evaluation of the passive sampler for microcystins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *390*(4), 1167–1172. https://doi.org/10.1007/s00216-007-1785-y
Kong, Y., Peng, Y., Zhang, Z., Zhang, M., Zhou, Y., & Duan, Z. (2019). Removal of Microcystis aeruginosa by ultrasound: Inactivation mechanism and release of algal organic matter. *Ultrasonics Sonochemistry*, *56*, 447–457. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.04.017
Kozik, C., Young, E. B., Sandgren, C. D., & Berges, J. A. (2019). Cell death in individual freshwater phytoplankton species: relationships with population dynamics and environmental factors. *European Journal of Phycology*, *54*(3), 369–379. https://doi.org/10.1080/09670262.2018.1563216
Kulabhusan, P. K., & Campbell, K. (2021). Recent trends in the detection of freshwater cyanotoxins with a critical note on their occurrence in Asia. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, *32*, e00150. https://doi.org/10.1016/j.teac.2021.e00150
Kurokawa, M., King, P. M., Wu, X., Joyce, E. M., Mason, T. J., & Yamamoto, K. (2016). Effect of sonication frequency on the disruption of algae. *Ultrasonics Sonochemistry*, *31*, 157–162. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.12.011
Kurtz, T., Zeng, T., & Rosario-Ortiz, F. L. (2021). Photodegradation of cyanotoxins in surface waters. *Water Research*, *192*, 116804. https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116804
Lee, T. J., Nakano, K., & Matsumara, M. (2001). Ultrasonic irradiation for blue-green algae bloom control. *Environmental Technology*, *22*(4), 383–390. https://doi.org/10.1080/09593332208618270
Lee, T. J., Nakano, K., & Matsumura, M. (2000). A new method for the rapid evaluation of gas vacuoles regeneration and viability of cyanobacteria by flow cytometry. *Biotechnology Letters*, *22*(23), 1833–1838. https://doi.org/10.1023/A:1005653124437
León, C., & Peñuela, G. A. (2019). Detected cyanotoxins by UHPLC MS/MS technique in tropical reservoirs of northeastern Colombia. *Toxicon*, *167*, 38–48. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.06.010
León Salazar, M. C. (2017). *Determinación del contenido de cianotoxinas en embalses del oriente antioqueño y evaluación de su eliminación en tratamientos de potabilización empleando la técnica UHPLC - MS/MS*. Universidad de Antioquia.
LGSONIC. (2020). *5 years and 5 successful projects with EPM*. https://www.lgsonic.com/cases/epm/
Li, J., Li, R., & Li, J. (2017). Current research scenario for microcystins biodegradation – A review on fundamental knowledge, application prospects and challenges. *Science of the Total Environment*, *595*, 615–632. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.285
Li, J., Liao, R., Tao, Y., Liu, Z., Wang, Y., & Ma, H. (2020). Evaluation for gas vesicles of sonicated cyanobacteria using polarized light scattering. *Optik*, *216*, 164835. https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2020.164835
Li, P., Song, Y., Yu, S., & Park, H. D. (2015). The effect of hydrodynamic cavitation on Microcystis aeruginosa: Physical and chemical factors. *Chemosphere*, *136*, 245–251. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.05.017
Liu, B., Qu, F., Liang, H., Van der Bruggen, B., Cheng, X., Yu, H., Xu, G., & Li, G. (2017). Microcystis aeruginosa-laden surface water treatment using ultrafiltration: Membrane fouling, cell integrity and extracellular organic matter rejection. *Water Research*, *112*, 83–92. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.033
Liu, C., Wang, J., Cao, Z., Chen, W., & Bi, H. (2016). Variation of dissolved organic nitrogen concentration during the ultrasonic pretreatment to Microcystis aeruginosa. *Ultrasonics Sonochemistry*, *29*, 236–243. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.09.017
Liu, Y., Liu, X., Cui, Y., & Yuan, W. (2022). Ultrasound for microalgal cell disruption and product extraction: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, *87*, 106054. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106054

Loaiza-González, J. M., Rubio-Clemente, A., León-Salazar, M. C., Rodríguez Loaiza, D. C., & Peñuela Mesa, G. A. (2021). Recurrencia de toxinas cianobacterianas en cuerpos de agua eutrofizados. In *Prácticas y herramientas de sostenibilidad* (pp. 153–181). Tecnológico de Antioquia Institución Universitaria.

Luo, A., Chen, H., Gao, X., Carvalho, L., Xue, Y., Jin, L., & Yang, J. (2022). Short-term rainfall limits cyanobacterial bloom formation in a shallow eutrophic subtropical urban reservoir in warm season. *Science of the Total Environment*, *827*, 154172. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154172

Ma, B., Chen, Y., Hao, H., Wu, M., Wang, B., Lv, H., & Zhang, G. (2005). Influence of ultrasonic field on microcystins produced by bloom-forming algae. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *41*(2–3), 197–201. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.12.010

Maghsoudi, E., Prévost, M., Vo Duy, S., Sauvé, S., & Dorner, S. (2015). Adsorption characteristics of multiple microcystins and cylindrospermopsin on sediment: Implications for toxin monitoring and drinking water treatment. *Toxicon*, *103*, 48–54. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.06.007

Malik, J. K., Bharti, V. K., Rahal, A., Kumar, D., & Gupta, R. C. (2020). Cyanobacterial (blue-green algae) toxins. In *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents* (pp. 467–478). INC. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819090-6.00031-3

Massey, I. Y., Yang, F., Ding, Z., Yang, S., Guo, J., Tezi, C., Al-Osman, M., Kamegni, R. B., & Zeng, W. (2018). Exposure routes and health effects of microcystins on animals and humans: A mini-review. *Toxicon*, *151*, 156–162. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.07.010

Merel, S., Clément, M., & Thomas, O. (2010). State of the art on cyanotoxins in water and their behaviour towards chlorine. *Toxicon*, *55*(4), 677–691. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.10.028

Merel, S., Villarín, M. C., Chung, K., & Snyder, S. (2013). Spatial and thematic distribution of research on cyanotoxins. *Toxicon*, *76*, 118–131. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.09.008

Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baurès, E., & Thomas, O. (2013). State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment International*, *59*, 303–327. https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.013

Montgomery, D. C. (2017). *Design and analysis of experiments* (Ninth). John wiley & sons.

Mowe, M. A. D., Mitrovic, S. M., Lim, R. P., Furey, A., & Yeo, D. C. J. (2015). Tropical cyanobacterial blooms: A review of prevalence, problem taxa, toxins and influencing environmental factors. *Journal of Limnology*, *74*(2), 205–224. https://doi.org/10.4081/jlimnol.2014.1005

Múnera Porras, L. M. (2017). *Identificación y cuantificación de cianobacterias planctónicas en los embalses Abreo Malpaso, Peñol-Guatapé y Playas del oriente antioqueño empleando técnicas moleculares*. Universidad de Antioquia.

Munoz, M., Cirés, S., de Pedro, Z. M., Colina, J. Á., Velásquez-Figueroa, Y., Carmona-Jiménez, J., Caro-Borrero, A., Salazar, A., Santa María Fuster, M. C., Contreras, D., Perona, E., Quesada, A., & Casas, J. A. (2021). Overview of toxic cyanobacteria and cyanotoxins in Ibero-American freshwaters: Challenges for risk management and opportunities for removal by advanced technologies. *Science of the Total Environment*, *761*, 143197. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143197

Navarro, E., Garcia-Berthou, E., & Armengol, J. (2010). La calidad ecológica de los embalses. *Investigación y Ciencia*, 80–88.

Neilan, B. A., Pearson, L. A., Muenchhoff, J., Moffitt, M. C., & Dittmann, E. (2012). Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, *15*(5), 1239–1253. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02729.x

Nowicka-Krawczyk, P., Żelazna-Wieczorek, J., Skrobek, I., Ziułkiewicz, M., Adamski, M., Kaminski, A., & Żmudzki, P. (2022). Persistent Cyanobacteria Blooms in Artificial Water Bodies—An Effect of Environmental Conditions or the Result of Anthropogenic Change. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(12), 6990. https://doi.org/10.3390/ijerph19126990

O'Neil, J. M., Davis, T. W., Burford, M. A., & Gobler, C. J. (2012). The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*, *14*, 313–334. https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.027

Olusoji, O. D., Spaak, J. W., Holmes, M., Neyens, T., Aerts, M., & De Laender, F. (2021). cyanoFilter: An R package to identify phytoplankton populations from flow cytometry data using cell pigmentation and granularity. *Ecological Modelling*, *460*, 109743. https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2021.109743

Paerl, H. W., & Barnard, M. A. (2020). Mitigating the global expansion of harmful cyanobacterial blooms: Moving targets in a human- and climatically-altered world. *Harmful Algae*, *96*, 101845. https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101845

Paerl, H. W., Gardner, W. S., Havens, K. E., Joyner, A. R., McCarthy, M. J., Newell, S. E., Qin, B., & Scott, J. T. (2016). Mitigating cyanobacterial harmful algal blooms in aquatic ecosystems impacted

by climate change and anthropogenic nutrients. *Harmful Algae*, *54*, 213–222. https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.09.009

Paerl, H. W., & Otten, T. G. (2013). Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. *Microbial Ecology*, *65*(4), 995–1010. https://doi.org/10.1007/s00248-012-0159-y

Paerl, H. W., Otten, T. G., & Kudela, R. (2018). Mitigating the Expansion of Harmful Algal Blooms Across the Freshwater-to-Marine Continuum [News]. *Environmental Science and Technology*, *52*(10), 5519–5529. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05950

Palacio Gómez, K., Hernández Atilano, E., Peñuela Mesa, G., Aguirre Ramírez, N., & Vélez Macías, F. (2019). Características morfológicas de las cianobacterias y fitoplancton dominante en tres embalses de Antioquia: un enfoque basado en la forma y el biovolumen. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, *22*(2), e1306. https://doi.org/10.31910/rudca.v22.n2.2019.1306

Pamplona-Silva, M. T., Gonçalves, L. C., & Marin-Morales, M. A. (2018). Genetic toxicity of water contaminated by microcystins collected during a cyanobacteria bloom. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *166*, 223–230. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.090

Park, J., Church, J., Son, Y., Kim, K. T., & Lee, W. H. (2017). Recent advances in ultrasonic treatment: Challenges and field applications for controlling harmful algal blooms (HABs). *Ultrasonics Sonochemistry*, *38*, 326–334. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.03.003

Park, J., Son, Y., & Lee, W. H. (2019). Variation of efficiencies and limits of ultrasonication for practical algal bloom control in fields. *Ultrasonics Sonochemistry*, *55*, 8–17. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.03.007

Parra-Enciso, C., Avila, B. S., Rubio-Clemente, A., & Peñuela, G. A. (2022). Degradation of diclofenac through ultrasonic-based advanced oxidation processes at low frequency. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *10*, 108296. https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.108296

Patterson, D. J. (1998). *Free-living Freshwater Protozoa*. Manson. https://doi.org/https://doi.org/10.1201/9781840765847

Pavlova, V., Stoyneva, M., Georgieva, V., Donchev, D., Spoof, L., Meriluoto, J., Bratanova, Z., & Karadjova, I. (2014). New Records of Microcystins in Some Bulgarian Water Bodies of Health and Conservational Importance. *Journal of Water Resource and Protection*, *6*(5), 446–453. https://doi.org/10.4236/jwarp.2014.65044

Peng, Y., Zhang, Z., Kong, Y., Li, Y., Zhou, Y., Shi, X., & Shi, X. (2020). Effects of ultrasound on Microcystis aeruginosa cell destruction and release of intracellular organic matter. *Ultrasonics Sonochemistry*, *63*, 104909. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104909

Pham, T. L., & Utsumi, M. (2018). An overview of the accumulation of microcystins in aquatic ecosystems. *Journal of Environmental Management*, *213*, 520–529. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.01.077

Pobel, D., Robin, J., & Humbert, J. F. (2011). Influence of sampling strategies on the monitoring of cyanobacteria in shallow lakes: Lessons from a case study in France. *Water Research*, *45*(3), 1005–1014. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.10.011

Pouria, S., De Andrade, A., Barbosa, J., Cavalcanti, R. L., Barreto, V. T. S., Ward, C. J., Preiser, W., Poon, G. K., Neild, G. H., & Codd, G. A. (1998). Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet*, *352*(9121), 21–26. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)12285-1

Purcell, D. (2009). *Control of Algal Growth in Reservoirs with Ultrasound*. Cranfield University, Englanel.

Purcell, D., Parsons, S. A., & Jefferson, B. (2013). The influence of ultrasound frequency and power, on the algal species Microcystis aeruginosa, Aphanizomenon flos-aquae, Scenedesmus subspicatus and Melosira sp. *Environmental Technology (United Kingdom)*, *34*(17), 2477–2490. https://doi.org/10.1080/09593330.2013.773355

Purcell, D., Parsons, S. A., Jefferson, B., Holden, S., Campbell, A., Wallen, A., Chipps, M., Holden, B., & Ellingham, A. (2012). Experiences of algal bloom control using green solutions barley straw and ultrasound, an industry perspective. *Water and Environment Journal*, *27*(2), 148–156. https://doi.org/10.1111/j.1747-6593.2012.00338.x

Rajasekhar, P., Fan, L., Nguyen, T., & Roddick, F. A. (2012a). A review of the use of sonication to control cyanobacterial blooms. *Water Research*, *46*(14), 4319–4329. https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.05.054

Rajasekhar, P., Fan, L., Nguyen, T., & Roddick, F. A. (2012b). Impact of sonication at 20kHz on Microcystis aeruginosa, Anabaena circinalis and Chlorella sp. *Water Research*, *46*(5), 1473–1481. https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.017

Rodriguez-Molares, A., Dickson, S., Hobson, P., Howard, C., Zander, A., & Burch, M. (2014). Quantification of the ultrasound induced sedimentation of Microcystis aeruginosa. *Ultrasonics Sonochemistry*, *21*(4), 1299–1304. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.01.027

Rubio-Clemente, A., Chica, E., & Peñuela, G. A. (2019). Benzo[a]pyrene Emerging Micropollutant Oxidation under the Action of Fenton Reactants in Real Surface Water: Process Optimization and Application. *Polycyclic Aromatic Compounds*, *41*(1), 95–108. https://doi.org/10.1080/10406638.2019.1570950

Sá, A. K. D. D. S., Cutrim, M. V. J., Costa, D. S., Cavalcanti, L. F., Ferreira, F. S., Oliveira, A. L. L., & Serejo, J. H. F. (2021). Algal blooms and trophic state in a tropical estuary blocked by a dam (Northeastern Brazil). *Ocean and Coastal Research*, *69*, e21009. https://doi.org/10.1590/2675-2824069.20-006akddss

Salomón, S., Rivera-Rondón, C. A., & Zapata, Á. M. (2020). Cyanobacterial blooms in Colombia: State of knowledge and research needs in the context of climate global change. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Fisicas y Naturales*, *44*(171), 376–391. https://doi.org/10.18257/raccefyn.1050

Santos, A., Rachid, C., Pacheco, A. B., & Magalhães, V. (2020). Biotic and abiotic factors affect microcystin-LR concentrations in water/sediment interface. *Microbiological Research*, *236*, 126452. https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126452

Schleiss, A. J., Franca, M. J., Juez, C., & De Cesare, G. (2016). Reservoir sedimentation. *Journal of Hydraulic Research*, *54*(6), 595–614. https://doi.org/10.1080/00221686.2016.1225320

Schneider, O. D., Weinrich, L. A., & Brezinski, S. (2015). Ultrasonic treatment of Algae in a New Jersey Reservoir. *Journal - American Water Works Association*, *107*(10), E533–E542. https://doi.org/10.5942/jawwa.2015.107.0149

Sedan, D., & Andrinolo, D. (2011). Cianobacterias y cianotoxinas: Efectos en la salud humana. Casos informados y primeros acercamientos al estudio epidemiológico. In *Cianobacterias como determinantes ambientales de la salud* (pp. 67–78). http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/91471

Simões, N. R., Nunes, A. H., Dias, J. D., Lansac-Tôha, F. A., Velho, L. F. M., & Bonecker, C. C. (2015). Impact of reservoirs on zooplankton diversity and implications for the conservation of natural aquatic environments. *Hydrobiologia*, *758*(1), 3–17. https://doi.org/10.1007/s10750-015-2260-y

Singh, A., & Babele, P. K. (2020). Dynamics of harmful cyanobacterial blooms and their toxins: environmental and human health perspectives and management strategies. In *Advances in Cyanobacterial Biology*. INC. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819311-2.00020-6

Smith, V. H., & Schindler, D. W. (2009). Eutrophication science: where do we go from here? *Trends in Ecology and Evolution*, *24*(4), 201–207. https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.11.009

Solis, M., Pawlik-Skowrońska, B., & Kalinowska, R. (2016). Seasonal changes of phytoplankton and cyanobacteria/cyanotoxin risk in two shallow morphologically altered lakes: Effects of water level manipulation (Wieprz-Krzna Canal System, Eastern Poland). *Ecological Indicators*, *66*, 103–112. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.01.021

Stewart, I., Seawright, A. A., & Shaw, G. R. (2008). Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds – an overview. In H. K. Hudnell (Ed.), *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 619, pp. 613–637). Springer, New York, NY. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-0-387-75865-7

Su, R. C., Lad, A., Breidenbach, J. D., Kleinhenz, A. L., Modyanov, N., Malhotra, D., Haller, S. T., & Kennedy, D. J. (2020). Assessment of diagnostic biomarkers of liver injury in the setting of microcystin-LR (MC-LR) hepatotoxicity. *Chemosphere*, *257*, 127111. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127111

Tan, X., Shu, X., Guo, J., Parajuli, K., Zhang, X., & Duan, Z. (2018). Effects of low-frequency ultrasound on Microcystis aeruginosa from cell inactivation to disruption. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *101*(1), 117–123. https://doi.org/10.1007/s00128-018-2348-y

Tang, J. W., Wu, Q. Y., Hao, H. W., Chen, Y., & Wu, M. (2004). Effect of 1.7 MHz ultrasound on a gas-vacuolate cyanobacterium and a gas-vacuole negative cyanobacterium. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *36*(2), 115–121. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.06.003

Trevino-Garrison, I., Dement, J., Ahmed, F. S., Haines-Lieber, P., Langer, T., Ménager, H., Neff, J., Van Der Merwe, D., & Carney, E. (2015). Human illnesses and animal deaths associated with freshwater harmful algal blooms—Kansas. *Toxins*, *7*(2), 353–366. https://doi.org/10.3390/toxins7020353

U.S. EPA (United States Environmental Protection Agency). (2017). *Single Laboratory Validated Method for Determination of Microcystins and Nodularin in Ambient Freshwaters by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS)*.

Umehara, A., Takahashi, T., Komorita, T., Orita, R., Choi, J. W., Takenaka, R., Mabuchi, R., Park, H. D., & Tsutsumi, H. (2017). Widespread dispersal and bio-accumulation of toxic microcystins in benthic marine ecosystems. *Chemosphere*, *167*, 492–500. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.029

Vidal, L., Ballot, A., Azevedo, S. M. F. O., Padisák, J., & Welker, M. (2021). Introduction to cyanobacteria. In *Toxic Cyanobacteria in Water* (pp. 163–211). https://doi.org/10.1201/9781003081449-3

Villanueva, M. V., Luna, M. C., Gil, M. I., & Allende, A. (2015). Ultrasound treatments improve the microbiological quality of water reservoirs used for the irrigation of fresh produce. *Food Research International*, *75*, 140–147. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.040

Walsby, A. E. (1992). A control of gas-vacuolate cyanobacteria. In D. W. Sutcliffe & J. G. Jones (Eds.), *Eutrophication: research and application to water supply* (pp. 150–162). Freshwater Biological Association.

Wang, C., Jia, H., Wei, J., Yang, W., Gao, Y., Liu, Q., Ge, D., & Wu, N. (2021). Phytoplankton functional groups as ecological indicators in a subtropical estuarine river delta system. *Ecological Indicators*, *126*, 107651. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107651

Wang, M., Shi, W., Chen, Q., Zhang, J., Yi, Q., & Hu, L. (2018). Effects of nutrient temporal variations on toxic genotype and microcystin concentration in two eutrophic lakes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *166*, 192–199. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.095

Wang, M., Yuan, W., Jiang, X., Jing, Y., & Wang, Z. (2014). Disruption of microalgal cells using high-frequency focused ultrasound. *Bioresource Technology*, *153*, 315–321. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.054

Wang, P., Du, B., Smith, J., Lao, W., Wong, C. S., & Zeng, E. Y. (2022). Development and field evaluation of the organic-diffusive gradients in thin-films (o-DGT) passive water sampler for microcystins. *Chemosphere*, *287*(P1), 132079. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132079

Wei, H., Jia, Y., & Wang, Z. (2022). Microcystin pollution in lakes and reservoirs: A nationwide meta-analysis and assessment in China. *Environmental Pollution*, *309*, 119791. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119791

Wells, M. L., Trainer, V. L., Smayda, T. J., Karlson, B. S. O., Trick, C. G., Kudela, R. M., Ishikawa, A., Bernard, S., Wulff, A., Anderson, D. M., & Cochlan, W. P. (2015). Harmful algal blooms and climate change: Learning from the past and present to forecast the future. *Harmful Algae*, *49*, 68–93. https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.07.009

Wert, E. C., Dong, M. M., & Rosario-Ortiz, F. L. (2013). Using digital flow cytometry to assess the degradation of three cyanobacteria species after oxidation processes. *Water Research*, *47*(11), 3752–3761. https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.038

WHO. (2011). *Guidelines for drinking-water quality, 4th edition*. The World Health Organization. https://www.who.int/publications/i/item/9789241548151

Wu, X., Joyce, E. M., & Mason, T. J. (2012). Evaluation of the mechanisms of the effect of ultrasound on Microcystis aeruginosa at different ultrasonic frequencies. *Water Research*, *46*(9), 2851–2858. https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.02.019

Xie, E., Su, Y., Deng, S., Kontopyrgou, M., & Zhang, D. (2021). Significant influence of phosphorus resources on the growth and alkaline phosphatase activities of Microcystis aeruginosa. *Environmental Pollution*, *268*, 115807. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115807

Yan, X., Xu, X., Wang, M., Wang, G., Wu, S., Li, Z., Sun, H., Shi, A., & Yang, Y. (2017). Climate warming and cyanobacteria blooms: Looks at their relationships from a new perspective. *Water Research*, *125*, 449–457. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.09.008

Yao, Y., Pan, Y., & Liu, S. (2020). Power ultrasound and its applications: A state-of-the-art review. *Ultrasonics Sonochemistry*, *62*, 104722. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104722

You, L., Tong, X., Te, S. H., Tran, N. H., bte Sukarji, N. H., He, Y., & Gin, K. Y. H. (2022). Multi-class secondary metabolites in cyanobacterial blooms from a tropical water body: Distribution patterns and real-time prediction. *Water Research*, *212*, 118129. https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118129

Yunes, J. S. (2019). Cyanobacterial Toxins. In *Cyanobacteria: From Basic Science to Applications* (pp. 443–458). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00022-2

Zhang, G., Zhang, P., Liu, H., & Wang, B. (2006). Ultrasonic damages on cyanobacterial photosynthesis. *Ultrasonics Sonochemistry*, *13*(6), 501–505. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2005.11.001

Zhang, G., Zhang, P., Wang, B., & Liu, H. (2006). Ultrasonic frequency effects on the removal of Microcystis aeruginosa. *Ultrasonics Sonochemistry*, *13*(5), 446–450. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2005.09.012

Zhang, L., Kang, C., Wu, C., Yu, H., Jin, J., Zhou, Y., & Zhou, T. (2022). Optimization of Drought Limited Water Level and Operation Benefit Analysis of Large Reservoir. *Water Resources Management*, *36*(12), 4677–4696. https://doi.org/10.1007/s11269-022-03271-5

Zhang, L., Yang, J., Liu, L., Wang, N., Sun, Y., Huang, Y., & Yang, Z. (2021). Simultaneous removal of colonial Microcystis and microcystins by protozoa grazing coupled with ultrasound treatment. *Journal of Hazardous Materials*, *420*, 126616. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126616

Zhao, K., Wang, L., You, Q., Zhang, J., Pang, W., & Wang, Q. (2022). Impact of cyanobacterial bloom intensity on plankton ecosystem functioning measured by eukaryotic phytoplankton and zooplankton indicators. *Ecological Indicators*, *140*(100), 109028. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.109028

Zhou, C., Chen, H., Zhao, H., & Wang, Q. (2021). Microcystin biosynthesis and toxic effects. *Algal Research*, *55*, 102277. https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102277

Zhou, J., Qin, B., Han, X., & Zhu, L. (2016). Turbulence increases the risk of microcystin exposure in a eutrophic lake (Lake Taihu) during cyanobacterial bloom periods. *Harmful Algae*, *55*, 213–220. https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.03.016

9. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que hicieron parte de este arduo proceso, y, en especial, al grupo GDCON por colocar a disposición todo su personal, equipos, materiales e insumos. Así mismo, a los grupos de Química Orgánica de Productos Naturales y GeoLimna, por acogerme en sus instalaciones y su apoyo constante en el desarrollo de las actividades planteadas. Particularmente, a la profesora Natalia Andrea Herrera por su constante acompañamiento, dedicación y asesoría.

Este trabajo de investigación se realizó en el marco del proyecto "*Agentes causantes del crecimiento de cianobacterias productoras de toxinas en embalses de agua de consumo y pesca*" código 66864, contrato 831-2019. En este sentido, se agradece al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación por la vinculación y financiamiento como estudiante de maestría.

Finalmente, se agradece a EPM por permitir el ingreso al embalse Porce II y brindar los medios necesarios para llevar a cabo la toma de muestras de agua superficial.

10. ANEXOS

10.1. Formato de captura de datos de campo

TOMA DE MUESTRAS DE AGUA EN CUERPOS LÉNTICOS
CAPTURA DE DATOS DE CAMPO

TIPO DE MATRIZ: Agua Superficial **CÓDIGO DE MUESTREO:** M22-0567

INFORMACIÓN DE CAMPO					
Sitio de muestreo	Embalse Porce II, Antioquia, Colombia				
Fecha	2022-09-02	**Hora inicial**	11:30	**Hora final**	14:30
Coordenadas	N 6 ° 48 ´ 30,6 ´´		W 75 ° 8 ´ 43,2 ´´		
Altitud	942,7 msnm				
Nivel del agua	3,10 m				
Transparencia (d)	1,43 m	$LZF = 2{,}7 \times d$	3,86 m		
Temperatura ambiente	32,5 °C				
Condiciones ambientales	Día soleado, parcialmente nublado Humedad relativa: 78% Sin precipitación desde la mañana del día anterior Época del año lluviosa				
Descripción del punto de muestreo	Se evidencia florecimiento de cianobacterias en ingreso al embalse hacia costado derecho de la presa, con visible coloración verde del agua y baja turbulencia. El embalse se encuentra en su nivel normal de operación, cota máxima. Hay represamiento de basuras, principalmente plásticos a orillas del sitio de muestreo. No se percibe mal olor. Se aprecia presencia de aves acuáticas circundantes. Se observa un pequeño afluente, sin embargo, operarios del embalse indican que es un nacimiento proveniente del sector el Mango y no representa una fuente de contaminación.				

	Temperatura (°C)	pH (unidades de pH)	ORP (mV)	Conductividad (µs/cm)	Oxígeno disuelto (mg O_2/L)	Sólidos sedimentables (mL/L)	Turbiedad (NTU)
Método	SM 2550 B	SM 4500 H+ B	SM 2580 B	SM 2510 B	SM 4500-O H	SM 2540 F	SM 2130 B
Intervalo de medición	2,0 - 40,0	4,0 - 10,0	200 - 800	25,0 - 12850	2,0 - 10,0	1,0 - 1000	0,02 - 1000
Equipo	HQ40D		Multímetro SensiON MM150		HQ40D	Cono Imhoff	TurbiQUANT 1100 T
Inventario/ Serie	183268		183447		183268	NA	201911586
Estándar	NA	7,0	220	1412	Cero/Saturada	NA	0,02
Verificación	23,4	7,01	220	1423	100%	NA	0,02

*La referencia SM corresponde a Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Ed. 23 de 2017.
*Intervalo de medición, estándar y verificación se encuentra en las mismas unidades de medida de la lectura de campo.

	Muestra Superficial (ZF)			Muestra Integrada (LZF)		
	Lectura muestra	Lectura réplica	%RPD	Lectura muestra	Lectura réplica	%RPD
Temperatura (°C)	30,6	29,7	2,99	25,9	25,7	0,78
pH (unidades de pH)	7,08	7,03	0,71	6,95	6,85	1,45
ORP (mV)	240	227	5,57	282	257	9,28
Conductividad (µs/cm)	59,7	59,1	1,01	59,6	59,0	1,01
Oxígeno disuelto (mg O_2/L)	7,57	7,48	1,20	6,62	6,54	1,22
Sólidos sedimentables (mL/L)	0	0	0	0	0	0
Turbiedad (NTU)	23,83	23,30	2,25	6,38	5,35	17,56

* La muestra integrada fue recolectada con botella Kemmerer.
* Registre en observaciones la información complementaria arrojada por el equipo de medición de Oxígeno disuelto.
* EL %RPD = 100 x (|Lectura 1 - Lectura 2|/(Promedio de lectura 1 y 2)); Donde; Lectura 1 = muestra; Lectura 2 = réplica

OBSERVACIONES:

Se decide comparar medición de conductividad in situ con réplica en el laboratorio, por incertidumbre del valor obtenido en campo, mucho más bajo de lo esperado.

Responsable: Jimmy Loaiza

10.2. Lista de chequeo de muestreo

LISTA DE CHEQUEO DE MUESTREO

DOCUMENTACIÓN	
Identificación personal	
Copia de póliza estudiantil	
Formato de captura de datos	
Tabla apoyo portadocumentos	
ELEMENTOS DE PROTECCION PERSONAL	
Tapabocas	
Guantes de látex	
Guantes de caucho largo	
Botas	
Gorra ala ancha	
Gafas protección solar	
Bloqueador solar	
Repelente para mosquitos	
Impermeable	
Botiquín de primeros auxilios	
ETIQUETADO Y EMBALAJE	
Cinta de enmascarar	
Lapicero	
Sharpie	
Etiquetas	
EQUIPOS Y REACTIVOS	
Multiparamétrico	
Oxímetro	
Turbidímetro	
GPS	
Calculadora	
Cronometro	
Cámara fotográfica	
Reactivos y soluciones de verificación	
Reactivos y soluciones para preservación de muestras en campo y tirillas de pH	

ELEMENTOS PARA TOMA DE MUESTRAS	
Recipientes para la toma de muestras	
Geles para refrigeración	
Cavas o neveras de almacenamiento	
Bolsas plásticas	
Alcohol al 70%	
Agua destilada	
Papel absorbente	
Balde plástico	
Agitador	
Probeta 1000 mL	
Cono Imhoff	
Disco Secchi con cuerda y peso	
Botella Kemmerer	
Cinta métrica	
Malla para fito y zooplancton	
RECIPIENTES PARA LA TOMA DE MUESTRAS	
Plástico 10 L	4
Plástico 1 L	2
Plástico 250 mL	2
Plástico ámbar 250 mL	2
Plástico ámbar 500 mL	4
Vidrio ámbar 500 mL	4
Vidrio ámbar 250 mL	2
Vidrio ámbar muflado 100 mL	4
Falcon 50 mL	2
Schott estéril 500 mL con réplica	4
TOTAL RECIPIENTES	**30**
Repuestos de cada tipo de recipiente	8
PRESERVANTES	
Gotero HNO_3, H_2SO_4, HCl	
Lugol	

OBSERVACIONES:

Materiales e insumos para ensayos

- 18 plástico ámbar 500 mL
- 45 falcon 50 mL Y 15 mL
- 45 vidrio ámbar 50 mL

Responsable: Jinna Loaiza

10.3. Carta de ingreso de muestras, tipo de recipientes y preservación

Medellín, 02 de septiembre de 2022

Cliente: GDCON Dirección: Calle 62 # 52-59 Teléfono: 219 65 71 NIT: 890.980.040-8	Contacto: **Jinna Marcela Loaiza González** Email: jinna.loaiza@udea.edu.co Sitio de muestreo: Porce II, Antioquia Fecha y hora de muestreo: 2022-08-17 12:00

Datos para elaborar la factura: **NO FACTURAR**

Por medio de la presente, se solicita la recepción de las siguientes muestras de agua superficial provenientes del Embalse Porce II, Antioquia. Mediante muestreo puntual se tomará dos tipos de muestras, una superficial (ZF) y otra integrada (LZF), para los análisis descritos a continuación:

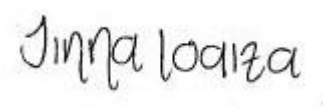
Descripción Muestra	Análisis Requeridos	Preservación*	Volumen	N° de recipientes
Embalse Porce II Agua Superficial	Alcalinidad total	Refrigeración. Plástico ámbar.	250 mL	2
	Color aparente			
	Dureza total	Refrigeración. Plástico. Acidificar con 1 mL HNO_3	250 mL	2
	Fósforo total	Refrigeración. Vidrio ámbar. Acidificar con 1 mL H_2SO_4	500 mL	2
	Fósforo soluble	Refrigeración. Vidrio ámbar. Recipiente lavado con HCl al 10%	250 mL	2
	Nitrógeno amoniacal	Refrigeración. Plástico. Acidificar con 1 mL H_2SO_4	1 L	2
	Nitrógeno total Kjeldahl			
	Nitratos y nitritos	Refrigeración. Tubo falcon.	50 mL	2
	COD	Refrigeración. Vidrio ámbar muflado. Acidificar con 5 gotas HCl	100 mL	2
	COT	Refrigeración. Vidrio ámbar muflado. Acidificar con 5 gotas HCl	100 mL	2
	Heterótrofos	Refrigeración. Schott estéril.	500 mL	2
	E. Coli y Coliformes totales			
	Cianotoxinas	Refrigeración. Vidrio ámbar. Adicionar 7,75 g/L trizma, 2,0 g/L 2-cloroacetamida, 0,35 g/L ácido etilendiaminotetraacético	500 mL	2
TOTAL			**3,5 L x 2**	**20**

*Las muestras llegan refrigeradas y preservadas respectivamente

Cordialmente,

Jinna Loaiza

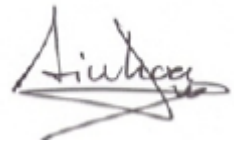
Jinna Marcela Loaiza González
CC 1.148.697.390





Nombre y Firma del Estudiante
JINNA MARCELA LOAIZA GONZÁLEZ
C.C. 1.148.697.390

Nombre y Firma del Director
GUSTAVO ANTONIO PEÑUELA MESA
C.C. 19.350.413



Nombre y Firma del Codirector
AINHOA RUBIO CLEMENTE
C.E. 417.927