



CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

INVESTIGACIÓN

Ensayos en laboratorio para el control de floraciones algales mediante ultrasonido

Kieffer, Luis A.^{1,2}; de la Sierra, Patricia M.^{1,2}; Devercelli, Melina³; Luna, Julio A.²; Claret, María⁴; Leiz, Estefanía⁴

Resumen

El mayor desarrollo de Cianobacterias generado por la eutroficación de ambientes acuáticos produce, además de afloramientos y compuestos con olores y sabores desagradables, liberación de metabolitos tóxicos. El desarrollo excesivo de algas también es problema para aguas que se pueden utilizar para consumo humano o procesos industriales, pero el tratamiento para su eliminación lleva a aumentos de los costos operativos. En este trabajo se analiza la utilización en laboratorio del ultrasonido como alternativa viable para controlar el desarrollo de algas, en particular de Cianobacterias. Los resultados obtenidos (utilizando una frecuencia de 20 kHz y una potencia de 9 W) muestran que los organismos pertenecientes a las Clases Chrysophyceae, Euglenophyceae y Chlorophyceae fueron eliminados a los 5 minutos de exposición, y *Raphidiopsis mediterranea* dentro de los primeros 10 minutos, en tanto que, luego de 60 minutos, la reducción fue del 98% para *M. aeruginosa* y del 99% para *Dolichospermum spiroides*.

Palabras clave: calidad de aguas; ultrasonido; microalgas

Artículo que expone resultados de proyectos de investigación del Grupo de Química Ambiental (FICH - INTEC), actualmente financiados a través de un CAI+D y un Proyecto de Cambio de Escala, ambos de la Universidad Nacional del Litoral; recibido: 14/05/14; admitido: 12/02/2015.

Autores: ¹Universidad Nacional del Litoral (UNL), Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas (FICH); ²UNL-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC); ³UNL-CONICET, Instituto de Limnología; ⁴Fundación VINTEC; Santa Fe (Santa Fe, Argentina). Contacto: lkieffer@santafe-conicet.gov.ar



Laboratory testing to control algae blooms by ultrasound

Abstract

An increased development of Cyanophyceae produced by eutrophication of the aquatic environments yields algae blooms and compounds with unpleasant odors and flavors as well as liberation of toxic metabolites. Excessive algae growth is also a problem for water that can be used for human consumption or industrial processes, but treatment for their removal leads to increases in operating costs. In this paper, the use of ultrasound to control algal blooms, in particular Cyanophyceae, at laboratory level is assayed. The results obtained (using a frequency of 20 kHz and a power of 9 W) show that organisms belonging to classes Chrysophyceae, Euglenophyceae and Chlorophyceae were removed after 5 minutes of exposure, and *Raphidiopsis mediterranean* within the first 10 minutes, while reduction was 98% for *M. aeruginosa* and 99% for *Dolichospermum spiroides* after 60 minutes.

Keys Words: water quality; ultrasound; microalgae

Ensaio em laboratório para o controle de florações algais mediante ultrassom

Resumo

O maior desenvolvimento de Cianobactéria gerado pela eutroficação de ambientes aquáticos produz, além de afloramentos e compostos com odores e sabores desagradáveis, liberação de metabólitos tóxicos. O desenvolvimento excessivo de algas é também problema para as águas que podem ser utilizadas para consumo humano ou processos industriais, porém o tratamento para sua eliminação acarreta aumentos nos custos operacionais. Neste trabalho é avaliado o uso em laboratório do ultrassom como alternativa viável para controlar o desenvolvimento de algas, principalmente de Cianobactérias. Os resultados obtidos (utilizando uma frequência de 20 kHz e uma potência de 9 W) mostram que os organismos pertencentes às Classes Chrysophyceae, Euglenophyceae e Chlorophyceae foram eliminados após 5 minutos de exposição, e *Raphidiopsis mediterrânea* dentro dos primeiros 10 minutos, enquanto que, após 60 minutos, a redução foi de 98% para *Microcystis aeruginosa* e de 99% para *Dolichospermum spiroides*.

Palavras-chave: qualidade das águas; ultrassom; microalgas

I. Introducción

La eutroficación se caracteriza por la disponibilidad excesiva de factores limitantes de la fotosíntesis (como la luz solar, el dióxido de carbono y nutrientes), que presenta consecuencias inmediatas como ser el excesivo desarrollo de plantas y algas (Schindler, 2006). La eutroficación es un proceso natural, que se produce muy lentamente (durante siglos) y que lleva al secado de los cuerpos lénticos (Carpenter, 1981). Sin embargo, las actividades humanas pueden acelerar la velocidad y grado de eutroficación, debido a que se han alterado los ciclos biogeoquímicos (Galloway *et al.*, 1995; Vitousek *et al.*, 1997a y b), por ejemplo duplicando la velocidad de ingreso de nitrógeno al ciclo terrestre del mismo (Vitousek *et al.*, 1997a). Las descargas (directas o indirectas) de nutrientes limitantes en los ecosistemas acuáticos (eutroficación cultural), dan lugar a graves consecuencias para su utilización como fuentes de agua potable, la pesca y usos recreativos (Carpenter *et al.*, 1998).

Las consecuencias conocidas de la eutroficación cultural incluyen las densas floraciones de algas que limitan la penetración de la luz, lo que reduce el crecimiento y causa la mortandad de plantas en zonas litorales a la vez que influye sobre la posibilidad de los depredadores para capturar a sus presas (Lehtiniemi *et al.*, 2005). Debido a la eutroficación, se producen cambios en la composición y estructura del fitoplancton, que generalmente derivan en un mayor desarrollo de Cianobacterias. La presencia de estos organismos representa un grave problema, ya que además de formar afloramientos y producir compuestos con olores y sabores desagradables, liberan metabolitos tóxicos (Izaguirre *et al.*, 1982; Carmichael, 1992; Pitois *et al.*, 2000). Por otra parte, las altas tasas de fotosíntesis pueden agotar el carbono inorgánico disuelto y elevar el pH durante el día, afectando las capacidades quimiosensoriales de los organismos (Turner y Chislock, 2010). Al producirse la senescencia de las floraciones de cianobacterias, las mismas son descompuestas por microorganismos, lo que da lugar a la formación de una zona de hipoxia o anoxia. Estas «zonas de alta productividad» se encuentran en muchos cuerpos de agua dulce durante el verano (Arend *et al.*, 2011; Díaz y Rosenberg, 2008). Existe también evidencia de la existencia de un vínculo directo entre la eutroficación y las enfermedades asociadas con el agua (Smith y Schindler, 2009): por ejemplo, el aumento de nitrógeno y la disponibilidad de fósforo aumenta la tasa de replicación de los virus acuáticos (Wilson *et al.*, 2006). Un estudio realizado en los EEUU estimó las pérdidas potenciales anuales debidas a la eutroficación (donde se incluyó el uso recreativo del agua, bienes raíces, recuperación de especies amenazadas y en peligro de

extinción y gasto de tratamiento de aguas para consumo) en $2,2 \cdot 10^9$ dólares/año (Dodds *et al.*, 2009).

En las aguas para abastecimiento de la población, los problemas causados por la proliferación de algas en el tratamiento varían en función de las especies presentes, por ejemplo las diatomeas, debido a la constitución silíceas de su pared celular y que forman colonias de hasta $4000 \mu\text{m}$, provocan la obstrucción de los filtros, lo que requiere del lavado a contracorriente para su eliminación (Bauer *et al.*, 1998; van den Hoek *et al.*, 1995). La presencia de algas verdes aumenta los niveles de turbidez y clorofila a, lo que requiere una mayor demanda de coagulante. Las cianobacterias dan lugar a la liberación de materia orgánica algocénica en su entorno durante el ciclo de crecimiento, provocan aumento de la turbidez y clorofila a lo que da lugar a la demanda adicional de compuestos químicos (Henderson *et al.*, 2008).

Otro problema asociado al desarrollo masivo de algas se presenta en las aguas de procesos industriales (en particular cuando se utilizan aguas 'naturales'), sobre todo en las utilizadas en sistemas de enfriamiento. Las dificultades asociadas con el uso de dichas aguas generalmente derivan de los depósitos (que incluyen partículas, sales, productos de corrosión y biopelículas) que se acumulan en las superficies de los sistemas de circulación y de los equipos, en particular en intercambiadores de calor. La presencia de un depósito también provoca un aumento en la pérdida de presión a través del sistema de conducción de agua. En ambos casos el requerimiento de energía adicional se sumará a los costos de operación (Bott, 1998).

Tanto para aguas destinadas a consumo (Chemat *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2006; Gogate, 2007; Broekman *et al.*, 2010; Matilainen y Sillanpaa, 2010; Doosti *et al.*, 2012), aguas de desecho (Blume y Neis, 2004; Antoniadis *et al.*, 2007; Maezawa *et al.*, 2007; Naddeo *et al.*, 2009; Drakopoulou *et al.*, 2009), aguas de proceso (Peterson y Pitt, 2000; Bott, 2001; Bott y Tianqing, 2004; Benzinger *et al.*, 2005), o en particular aguas con elevados contenidos de algas (Lee *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2009; Heng *et al.*, 2009; Koropoulis *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2012; Rajasekhar, *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2013; Rodriguez-Molares *et al.*, 2014) y cianotoxinas (Song *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2006; Srisuksomwong *et al.*, 2011; Claret *et al.*, 2012) el tratamiento mediante ultrasonido se presenta como una metodología atrayente dentro de los métodos de oxidación avanzados (Mahvi, 2009) debido a las ventajas que presenta, a saber: obtención de condiciones extremas de temperaturas y presiones no alcanzables por métodos tradicionales (superiores a los 5000 K y 1000 atm . (Adewuyi, 2001) y el poder trabajar con soluciones coloreadas o conteniendo material en suspensión. La irradiación ultrasónica de solucio-

nes acuosas da lugar a la formación, crecimiento y colapso de burbujas en el líquido. Este fenómeno (cavitación) favorece la actividad química (Suslick, 1990) debido a la formación de radicales hidroxilo, altamente reactivos (Gonzalez-Labrada *et al.*, 2010).

La gran mayoría de los promisorios ensayos acerca de la aplicación del ultrasonido para el control de algas fueron efectuados en laboratorio, con cultivos puros. En la **Tabla 1** se presentan resultados de la revisión bibliográfica realizada. La misma no pretende ser exhaustiva sino reflejar el amplio campo de condiciones (frecuencias y potencias) empleado en los estudios, los variados resultados obtenidos en los mismos, así como el hecho de que la mayoría de los ensayos fueron realizados con cultivos puros (especialmente *Microcystis aeruginosa*) y los escasos empleos sobre comunidades naturales.

La aplicación del ultrasonido podría dar lugar a la liberación de microcistinas al medio, aumentando con ello su toxicidad. Al respecto, Zhang *et al.* (2006a y b) recomiendan utilizar para el tratamiento de aguas destinadas a consumo, potencias iguales o inferiores a 48 W, dado que mostraron que una potencia de 80 W aumenta la concentración de microcistinas disueltas. También demostraron que las diferentes frecuencias tienen poco impacto sobre la liberación de dichas toxinas. Rajasekhar *et al.* (2012a y b) encontraron, para diferentes potencias, un aumento de las concentraciones de microcistinas disueltas en los primeros 5 minutos de aplicación del ultrasonido, pero dichas concentraciones disminuyen si se continúa con el tratamiento. Exista o no aumento en la liberación de toxinas, gran cantidad de trabajos señalan la efectividad del ultrasonido para la degradación de dichos compuestos (Ma *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2006; Hudder *et al.*, 2007; Srisuksomwong *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2012; Claret *et al.*, 2012).

II. Objetivo

La mayoría de los trabajos encontrados en la bibliografía fueron realizados con cultivos puros de algas. Es bien conocido que las características de algunas algas (especialmente *M. aeruginosa*) cultivadas en condiciones de laboratorio difieren de las que se encuentran en condiciones naturales (Yu *et al.*, 2013), lo cual puede jugar un papel crítico al utilizar un proceso para el tratamiento de aguas. El objetivo del presente trabajo fue estudiar en laboratorio el efecto de la irradiación ultrasónica sobre una comunidad fitoplanctónica natural compuesta principalmente por cianobacterias, con el propósito de aportar nueva información al amplio abanico de resultados existentes y evaluar la posibilidad de utilizar esta técnica para su control.

TABLA 1. Aplicación de ultrasonido para el control de algas

Autor (año)	Especie	Frecuencia y potencia	Tiempo (min)	Efecto observado
Hao <i>et al.</i> (2004)	<i>Spirulina platensis</i>	a) 1.7 kHz – 0,07 W/cm ³ b) 20 kHz – 0,014 W/cm ³	5	a) 50% reducción concentración b) 33,3 % reducción concentración
Tang <i>et al.</i> (2004)	<i>Microcystis aeruginosa</i>	1,7 MHz – 0,6 W/cm ²	5	La propagación se ve afectada por el U.S., pero recupera su nivel normal luego de 24 hs de interrumpido
Ma <i>et al.</i> (2005)	<i>Microcystis sp.</i>	20 kHz – 30 W	9	39% reducción en la concentración
Mahvi y Dehghani (2005)	No especificada.	42 kHz – 70 W	2,5	100% Inhibición del crecimiento
Zhang <i>et al.</i> (2006 a)	<i>Microcystis aeruginosa</i>	20, 80, 150, 410, 690 y 1320 kHz – 80 W	10	14% reducción (20 kHz) 62% reducción (1320 kHz)
Zhang <i>et al.</i> (2006 b)	<i>Microcystis aeruginosa</i>	25 kHz – 0,32 W/ml	5	21,3% reducción en la concentración. de clorofila a 10,8% reducción en la concentración. de células
Zhang <i>et al.</i> (2009)	<i>Microcystis aeruginosa</i>	150 kHz – 47.2 W/cm ²	1/30	Colapso de células
Heng <i>et al.</i> (2009)	Comunidad natural: 32% <i>Microcystis</i> ; 15% <i>Scenedesmus</i> ; 26% <i>Chlorella</i> ; 27% Otras	a) 40 kHz – 40-120 W b) 60 – 80 kHz – 60 W	1/4 (40 kHz – 60W)	Colapso de células
Kotopoulos <i>et al.</i> (2009)	<i>Anabaena sphaerica</i>	200 kHz; 1,0 MHz; 2,2 MHz	no indicado	Sedimentación de las células
Joyce <i>et al.</i> (2010)	<i>Microcystis aeruginosa</i>	40 – 864 kHz 0,021 – 0,049 W/cm ³	30	21,3% reducción en la concentración
Wu <i>et al.</i> (2011)	<i>Microcystis aeruginosa</i>	a) 1146 kHz – 0,0018 W/cm ³ b) 580 kHz – 0,0041 W/cm ³ c) 20 kHz – 0,0403 W/cm ³	30	a) 8,3% reducción en la concentración. b) 22,1% reducción en la concentración. c) 49,2% reducción en la concentración
Rajasekhar <i>et al.</i> (2012a)	<i>Microcystis aeruginosa</i>	20 kHz – 0.043; 0,085; 0,139; 0,186; 0,32 W/ml	20	≈ 70% reducción (0,32 W/ml) ≈ 21% reducción (0,043 W/ml)
Jachlewski <i>et al.</i> (2013)	<i>Microcystis aeruginosa</i> a) cultivo puro b) cultivo de una represa	256 kHz	Flujo cte. 15,4 l/min (9 días de tratamiento)	a) reducción 8,2 veces la concentración. de clorofila a b) reducción 3,3 veces la concentración. de clorofila a
Wang <i>et al.</i> (2014)	<i>Scenedesmus dimorphus</i> <i>Nannochloopsis oculata</i>	a) 3,2 MHz – 40 W b) 20 kHz – 100 W	5	<i>S. dimorphus</i> No se observaron cambios significativos en el número de células <i>N. oculata</i> a) disminución del 8,9% en la concentración. de células b) disminución en el 27% en la concentración. de células

III. Materiales y métodos

Las muestras de fitoplancton se extrajeron del lago Pedro Antonio Francisco Candiotti, un lago urbano eutrófico situado en la zona céntrica de la ciudad de Santa Fe sobre el cual ya se habían efectuado estudios previos (Kieffer, 2000; Kieffer *et al.*, 2000a y b) y donde se había detectado la floración de cianobacterias como un problema grave. El lago está enclavado en el Parque del Sur, el cual forma parte del circuito turístico obligado dado que se encuentra dentro del casco fundacional (donde se destacan edificios aislados de distintas épocas de construcción: Templo y Convento de San Francisco, Museo Etnográfico, Museo Histórico Provincial, Casa de Gobierno), sitio profusamente utilizado como lugar de esparcimiento por la ciudadanía santafesina. Los problemas ambientales del lago comienzan a registrarse a partir de 1975, lo que da lugar a que en 1985 fuera clausurado como balneario (como consecuencia del desarrollo masivo de algas y de los elevados contenidos en bacterias) por el perjuicio que podría tener para la salud de los bañistas. Este lago es en realidad un cuerpo de agua somero (profundidad máxima, 5,25 m) con una longitud máxima (NE-SO) de 800 m y una superficie de aproximadamente 11 Ha. y originalmente era un brazo del riacho Santa Fe.

Las muestras de agua fueron extraídas a fines de agosto de 2011 en el extremo SO del lago ($31^{\circ} 39' 54,27''$ S – $60^{\circ} 42' 48,66''$ O; cercano al vertedero que el mismo posee), utilizando para ello una botella tipo Van Dorn vertical de 3 litros de capacidad. Una vez extraídas, las aguas fueron colocadas en botellas de vidrio actínico y mantenidas en hielo hasta su ingreso al laboratorio, donde se procesaron el mismo día. En campo se realizaron mediciones *in situ* utilizando un equipo multiparamétrico Horiba U10 (**Tabla 2**).

TABLA 2. Características fisicoquímicas del agua, medidas en el sitio de muestreo

Parámetro	Unidades	Valor medido
Temperatura del agua	°C	17,2
Conductividad	mS/cm	4,63
pH	upH	7,7
Turbiedad	UNT	21
Oxígeno disuelto	mg/l	8,4

NOTA: mS = mili Siemens; UNT = unidades nefelométricas de turbiedad.

Para el tratamiento mediante ultrasonido se utilizó un equipo MSE provisto de un cabezal de 13 mm de diámetro, operando a una frecuencia de 20

kHz, sumergido en el líquido 2,0 cm. La potencia entregada por el equipo fue determinada mediante calorimetría (Thompson y Doraiswamy, 1999) en experiencias efectuadas por triplicado, dando una potencia efectiva de 9 Watt. Se utilizó un reactor de vidrio de 250 ml de capacidad, provisto de camisa de refrigeración por la que se circuló agua para regular la temperatura de operación en $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Los ensayos (tanto para analizar el decaimiento de las algas, como la degradación de clorofila a) se hicieron por triplicado, sobre un volumen de 230 ml. Para las algas se extrajeron muestras de 5 ml a los 0, 5, 10, 20, 30, 45 y 60 minutos de tratamiento, fijándolas con lugol acético y efectuando los recuentos con microscopio invertido (Utermöhl, 1958). Para clorofila a también se tomaron muestras de 5 ml a los mismos tiempos (excepto a los 45 minutos), realizando las determinaciones mediante extracto acetónico con espectrofotómetro (método 10200 H, APHA, AWWA, WPCF, 1992).

Dado que se efectuaron tres ensayos (tanto para las algas como para clorofila a), se analizó si entre las mismas existían diferencias significativas mediante análisis de la varianza (ANDEVA) (Winer, 1971). Con el fin de ajustar la cinética de degradación a los datos obtenidos, se utilizó el programa Table-Curve 2D versión 5.01 (SYSTAT, 2002).

IV. Resultados y discusión

La composición taxonómica de la comunidad fitoplanctónica estudiada fue la siguiente:

Cyanobacteriaphyceae	
<i>Microcystis aeruginosa</i>	89,0 %
<i>Dolichospermum spiroides</i>	6,9 %
<i>Raphidiopsis mediterranea</i>	1,4 %
Bacillariophyceae	1,8 %
Chrysophyceae, Euglenophyceae y Chlorophyceae	0,7 %
Otras	0,2 %

En la **Tabla 3** se presentan los resultados de la aplicación del ultrasonido a las muestras de aguas conteniendo las especies antes mencionadas. Bajo condiciones naturales las células de *M. aeruginosa* se agregan secretando material intracelular, formando colonias amorfas (Yu *et al.*, 2013) y esta agregación favorece su supervivencia ante predadores (Yang *et al.*, 2008). Los cultivos en laboratorio tienen mayor número de células aisladas que agrupa-

das y menor cantidad de material extracelular segregado, lo que favorece su destrucción (Zhang y Yu, 2007; Yang *et al.*, 2008). Al aplicar ultrasonido de bajas frecuencias predominan los efectos mecánicos/físicos (altas fuerzas de corte) sobre los efectos químicos (producción de radicales) y estos últimos crecen al aumentar las frecuencias (Mason *et al.*, 2011). Wu *et al.* (2012) utilizan este hecho para explicar el mayor poder de inactivación de las células de cianobacterias por las bajas frecuencias (20 kHz) frente a las frecuencias medias (580 kHz) y altas (1146 kHz). Los mismos autores indican que se observa un efecto de desagregación de las colonias utilizando la frecuencia de 1146 kHz (aunque no indican tiempos de desaparición de los agregados). Los datos de la **Tabla 3** muestran que la frecuencia utilizada en este trabajo (20 kHz) también da lugar a la desagregación de las células en las tres especies, variando el tiempo desde menos de 5 minutos para *D. spiroides* y *R. mediterranea* a 45 minutos para *M. aeruginosa*.

TABLA 3. Disminución de las concentraciones de algas en función del tiempo por aplicación de ultrasonido

M. aeruginosa		Células aisladas (cél/ml)			Células agregadas (cél/ml)		
Tiempo (m)	Máximo	Mínimo	Promedio	Máximo	mínimo	Promedio	
0	153539	104008	136367	30212307	16038358	25403472	
5	3161178	2942302	2957450	871246	265659	645190	
10	2452753	2230535	2377567	1219183	226322	711305	
20	2140311	1394174	1676975	85928	12030	57563	
30	1727364	1120473	1385747	33930	0	11310	
45	1075526	866436	970265	0	0	0	
60	456518	407164	430556	0	0	0	
D. spiroides		Células aisladas (cél/ml)			Células agregadas (cél/ml)		
Tiempo (m)	Máximo	Mínimo	Promedio	Máximo	mínimo	Promedio	
0	14153	7387	10104	864959	417167	600059	
5	205510	118294	151376	0	0	0	
10	87718	58478	74630	0	0	0	
20	18546	15037	17270	0	0	0	
30	29689	10025	17608	0	0	0	
45	10025	5729	7399	0	0	0	
60	6169	4627	5141	0	0	0	
R. mediterranea		Células aisladas (cél/ml)			Células agregadas (cél/ml)		
Tiempo (m)	Máximo	Mínimo	Promedio	Máximo	mínimo	Promedio	
0	0	0	0	864959	417167	600059	
5	20050	12030	16263	0	0	0	
10	0	0	0	0	0	0	
20	0	0	0	0	0	0	
30	0	0	0	0	0	0	
45	0	0	0	0	0	0	
60	0	0	0	0	0	0	

En la **Tabla 4** se presentan los resultados del ANDEVA. Puede observarse que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres ensayos (tanto para las algas como para clorofila a), por lo que pueden utilizarse sus valores promediados con el fin de analizar la cinética de la disminución de las concentraciones por aplicación de ultrasonido.

TABLA 4. ANDEVA de los datos crudos

Especie	Fuente	S.C.	g.l.	C.M.	F	p
M. aeruginosa	Entre	1,76324E13	2	8,81619E12	0,10046	0,9049
	Dentro	1,57965E15	18	8,77585E13		
	Total	1,59728E15	20			
D. spiroides	Entre	242887E10	2	1,21444E10	0,22755	0,7987
	Dentro	9,60681E11	18	5,33712E10		
	Total	9,8497E11	20			
R. mediterranea	Entre	1,39114E8	2	6,95571E7	0,09609	0,9088
	Dentro	1,30304E10	18	7,2391E8		
	Total	1,31695E10	20			
Clorofila a	Entre	7233,33	2	3616,67	0,03362	0,9670
	Dentro	1,61354E6	18	107569,0		
	Total	1,62077E6	20			

NOTA: S.C.: suma de cuadrados; g.l.: grados de libertad; C.M.: cuadrado medio; F: estadístico de Snedecor; p: probabilidad.

En la **Figura 1** se presenta la disminución en el número de individuos/ml de toda la comunidad fitoplanctónica, mientras que en la **Figura 2** se grafica el decaimiento en la concentración de clorofila a. No se presentan gráficas de abatimiento de las Clases Chrysophyceae, Euglenophyceae y Chlorophyceae dado que dichos organismos fueron eliminados dentro de los 5 minutos de exposición. Por otra parte, las Bacillariophyceae persistieron durante toda la experiencia, posiblemente debido a la protección que le brindaron sus frústulos silíceos.

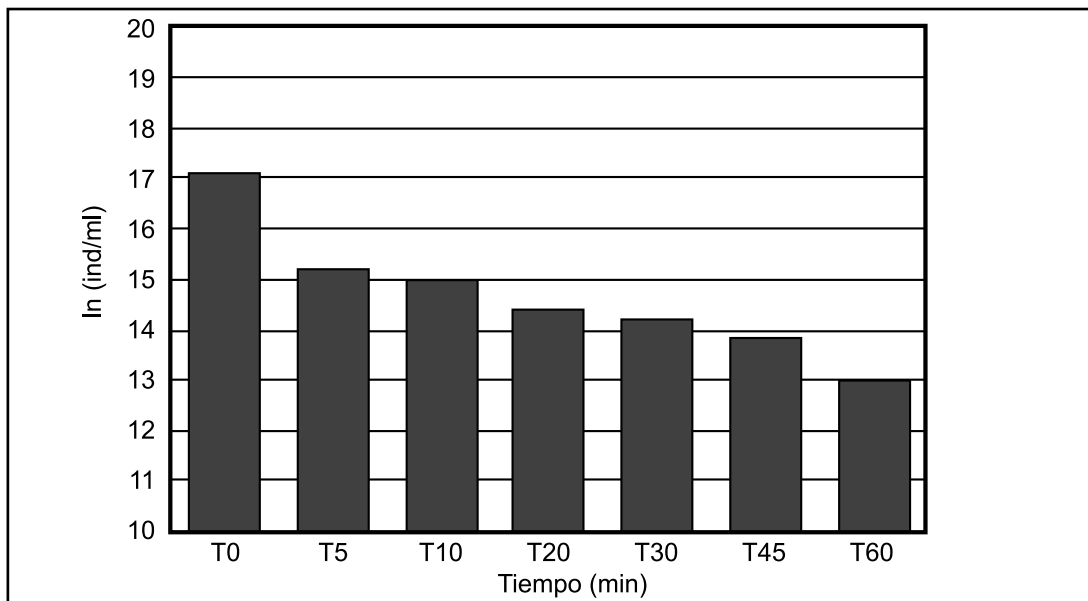


FIGURA 1. Decaimiento del fitoplancton total (valores de la ordenada en logaritmos naturales del número de individuos por mililitro)

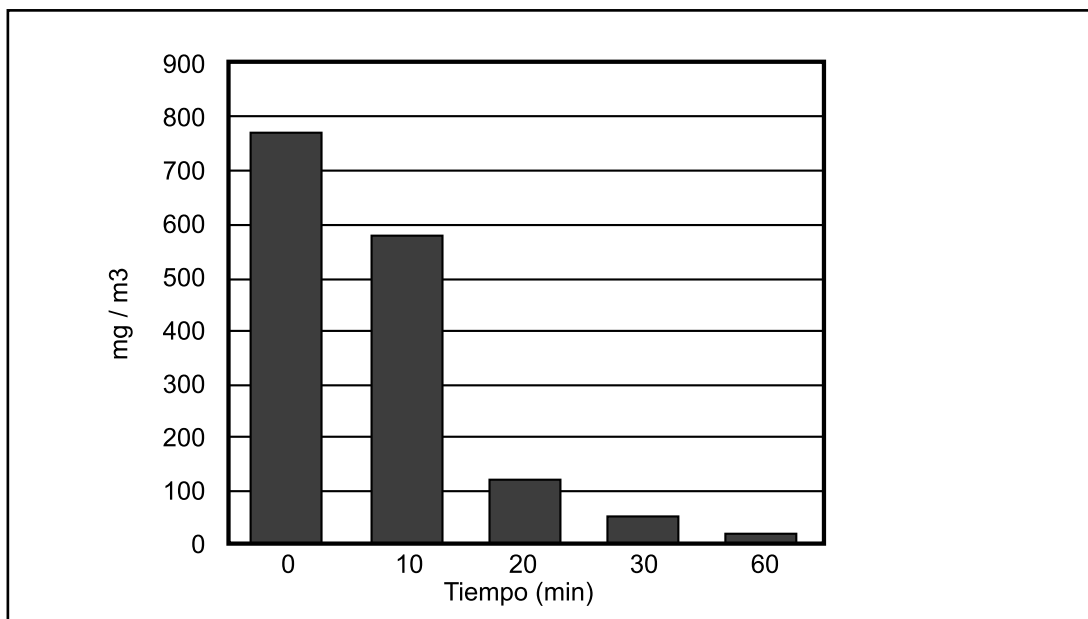


FIGURA 2. Decaimiento de la concentración de clorofila a en función del tiempo

De acuerdo a Rajasekhar (2012b), si se deseara utilizar el ultrasonido para el control de cianobacterias en aguas (cualquiera fuera su uso), deberían analizarse los parámetros ideales (frecuencia, potencia, pH, temperatura, salinidad, etc) es decir, aquellos que causen la sedimentación de las células (por colapso de las vacuolas de gas), daño a las membranas celulares (pero

no lisis, para evitar liberación de compuestos intracelulares) o inhibición de pigmentos (con afectación del crecimiento). Las vacuolas de gas proveen de flotación a las cianobacterias ayudándolas a regular su posición en la columna de agua y con ello su exposición a la luz, un parámetro importante para su crecimiento (Rajasekhar *et al.*, 2012a y b). Algunos autores (Zhang *et al.*, 2009; Heng *et al.*, 2009) señalan que con tiempos de sonicación sumamente cortos (inferiores a 30 segundos) se logra un alto porcentaje de remoción por coagulación de las algas, por lo que sería preferible la aplicación de exposiciones cortas repetidas, antes que prolongadas (Tang *et al.*, 2004). Estos cortos tiempos de aplicación se explican a partir de los tiempos necesarios para la creación e implosión de burbujas debido a la aplicación del ultrasonido, los que pueden calcularse mediante (Zhang *et al.*, 2009):

$$t_{cr} = 0,75 \cdot \frac{1}{f} + (i - 1) \cdot \frac{1}{f}$$

$$t_{co} = 0,915 \cdot R_m \sqrt{\frac{\rho}{P}}$$

$$R_m = 0,328 \cdot \frac{1}{f}$$

Donde t_{cr} es el tiempo de crecimiento de la burbuja (en segundos); f la frecuencia del ultrasonido (en kHz); i el número de ciclos acústicos que soporta la burbuja; t_{co} el tiempo de colapso de la burbuja (en segundos); R_m es el radio máximo (en cm); ρ la densidad del líquido y P la presión del sistema. Teniendo en cuenta que el medio es agua ($\rho = 1000 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$), la presión de una atmósfera ($P = 10^5 \text{ Pa}$) y que el número de ciclos que soporta una burbuja antes de colapsar es en promedio igual a 10 (Show *et al.*, 2007), para la frecuencia de 20 kHz los valores que se obtienen son: $R_m = 0,164 \text{ mm}$; $t_{cr} = 0,2 \text{ ms}$; $t_{co} = 1,5 \text{ ms}$; con lo cual el tiempo total de crecimiento y colapso de una burbuja estaría en el orden de 1,7 ms. El gas en las vacuolas actuaría como núcleo de cavitación lo que daría lugar al crecimiento y colapso de las vacuolas en tiempos inferiores al segundo, por lo que aplicaciones continuas o por tiempos prolongados del ultrasonido sólo aumentaría la posibilidad de lisis celular y con ello la liberación de sustancias (entre ellas las cianotoxinas). Sin embargo, la rotura de las vacuolas no produce la muerte de las células, dado que las mismas pueden regenerarse (Wu *et al.*, 2012) bajo condiciones adecuadas de iluminación (Rajasekhar, 2012 b), por lo que la aplicación de esta metodología sería efectiva en sitios donde la profundidad de la columna de agua fuera superior a la de la zona fótica.

Otra ruta posible de inactivación de las algas es el daño que produce la aplicación del ultrasonido sobre la clorofila a, reduciendo la capacidad fotosintética y con ello la posibilidad de sobrevivencia. Al respecto todos los trabajos muestran altas reducciones en las concentraciones de clorofila a al aplicar ultrasonido a diferentes frecuencias y potencias (Ahn *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006a y b; Zhang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2012); sin embargo existen diferencias al comparar las velocidades de degradación de dicho pigmento con la de inactivación de las algas (Rajasekhar *et al.*, 2012b), aun cuando las cinéticas obtenidas para ambos procesos son de primer orden (Zhang *et al.*, 2006a; Wu *et al.*, 2011).

Utilizando los valores medios de las densidades (individuos/ml) y de concentraciones de clorofila a (mg/m^3), se ajustaron cinéticas de primer orden, mediante el software TableCurve 2D (**Tabla 5**). En los cinco casos se observa que los ajustes son muy buenos, dado que el porcentaje de la varianza no explicada es inferior al 2,5% para el caso de las algas y menor al 9% para clorofila a. Por otra parte, también en dicha tabla puede observarse la efectividad del tratamiento mediante ultrasonido para el control de las floraciones de cianobacterias, dado que los tiempos de vida medio son inferiores a los 3 minutos.

TABLA 5. Decaimiento exponencial

	a	k (minutos ⁻¹)	R ²	F	T (minutos)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	99,704	0,34900	0,97517	197,096	1,99
<i>Dolichospermum spiroides</i>	99,604	0,25704	0,99437	875,367	2,70
<i>Raphidiopsis mediterranea</i>	100,207	0,30915	0,99552	1696,414	2,24
Fitoplancton total	99,694	0,34484	0,97561	197,095	2,01
Clorofila a	105,810	0,06523	0,91442	32,054	10,63

NOTA: a = ordenada en el origen; k = constante de decaimiento exponencial; R² = coeficiente de correlación al cuadrado; F = estadístico de Snedecor y T = tiempo de vida medio.

La velocidad de degradación de clorofila a mostró ser inferior a la velocidad de inactivación de las algas, hecho también señalado por Zhang *et al.* (2006b) y por Nakano *et al.* (2001) aunque contrario a lo encontrado por Purcell (2009 – citado en Rajasekhar *et al.*, 2012 b).

La seguridad de la aplicación de ultrasonido de alta frecuencia (> 0,5 MHz) para diagnóstico médico está garantizada por diversas normas de seguridad, por ejemplo las emitidas por la International Electrotechnical Commission (Ahmadi *et al.*, 2012). Sin embargo, no existen normas equivalentes para las

aplicaciones de bajas frecuencias (< 500 kHz) como son las utilizadas en intervenciones dentales o quirúrgicas (O'Daily *et al.*, 2008; Alves Pereira *et al.*, 2010). Los límites de seguridad, se basan en dos índices: el térmico y el mecánico (National Institute of Health, 2000). En el caso de que no exista contacto directo con el transductor de ultrasonido, el segundo índice es el más importante dado que tiene en cuenta los posibles efectos biológicos debido a la cavitación y en su definición original es igual al cociente entre la máxima presión negativa sufrida por la burbuja y la raíz cuadrada de la frecuencia. En aplicaciones de diagnóstico (altas frecuencias) dicho índice tiene un umbral de 0,7, valor por debajo del cual no existiría riesgo. Para el rango de bajas frecuencias existen discrepancias respecto a la definición del índice mecánico (Ahmadi *et al.*, 2012), por lo que aún no existe un único valor umbral para su utilización segura. La NATO (2006) en sus normas y procedimientos para riesgos para buceo humano y mamíferos marinos, fija valores máximos de presión acústica para buceadores militares: para frecuencias entre 4 y 25 kHz y a una distancia de 10 m el mismo es de 167 dB (valor del orden al utilizado en nuestro trabajo). Este último dato, unido a la incertidumbre respecto al índice mecánico, muestra la necesidad de mayores estudios sobre los posibles efectos del ultrasonido de baja frecuencia sobre las comunidades naturales.

V. Conclusiones

La irradiación ultrasónica produjo notorios cambios en la comunidad fitoplanctónica natural:

a) Los organismos pertenecientes a las Clases Chrysophyceae, Euglenophyceae y Chlorophyceae fueron eliminados a los 5 minutos de exposición. Las Bacillariophyceae persistieron durante toda la experiencia, posiblemente debido a la protección brindada por sus frústulos silíceos.

b) Las colonias y tricomas de las especies de Cianobacterias estudiadas fueron reducidas a células aisladas dentro de los primeros 5 minutos. Solo persistieron algunas colonias de *Microcystis aeruginosa* que fueron reduciéndose en tamaño y cantidad de células a medida que aumentaba el tiempo de exposición. Al cabo de 10 minutos de tratamiento con ultrasonido, *Raphidiopsis mediterranea* estuvo ausente. Al cabo de 60 minutos, la reducción fue del 98% para *Microcystis aeruginosa* y del 99% para *Dolichospermum spiroides*.

c) Los tiempos de vida medio para las cianobacterias fueron inferiores a los 3 minutos.

d) El aumento en el número de células aisladas de cianobacterias en los primeros tiempos de sonicación podría ser contraproducente para la disminu-

ción del desarrollo de estas algas si no se continúa con el tratamiento ultrasónico durante el tiempo adecuado, ya que las células aisladas de *Microcystis aeruginosa* pueden actuar como propágulos, incluso luego de permanecer largo tiempo depositadas en el sedimento de un sistema acuático.

e) Los cambios en la densidad del fitoplancton y la disminución en la concentración de clorofila a permiten concluir que bajo las condiciones de tratamiento utilizadas en este estudio (20 kHz y 0,036 W/ml), la irradiación ultrasónica disminuyó de manera significativa los niveles de cianobacterias luego de 60 minutos de aplicación de ultrasonido.

f) Las condiciones aplicadas en este estudio pueden compararse con las utilizadas por Wu (2011) (20 kHz – 0,0403 W/cm³) y Rajasekhar *et al.* (2012) (20 kHz – 0,043 W/ml), si bien en ambos casos las potencias empleadas fueron algo mayores. El porcentaje de degradación logrado en nuestro estudio fue superior a ambos, teniendo en cuenta que en los trabajos citados se utilizaron cultivos puros de *Microcystis aeruginosa*, mientras que para este trabajo se usó dicha especie formando parte de una comunidad natural.

g) Si bien en las condiciones de este trabajo se muestra la efectividad del ultrasonido para controlar floraciones de cianobacterias, son necesarios mayores estudios sobre los efectos en el resto de los integrantes de las comunidades acuáticas.

Referencias bibliográficas

- ADEWUYI, Y.G. (2001). Sonochemistry: environmental science and engineering applications, en: *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 40(22): 4681-4715.
- AHMADI, F.; McLOUGHLIN, I.V.; CHAUHAN, S.; TER-HAAR, G. (2012). Bio-effects and safety of low-intensity, low-frequency ultrasonic exposure, en: *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 108(3):119-138.
- AHN, C.Y.; PARK, M.H.; JOUNG, S.H.; KIM, H.S.; JANG, K.Y.; OH, H.M. (2003). Grow Inhibition of cyanobacteria by ultrasonic radiation: laboratory and enclosure studies, en: *Environmental Science & Technology*, 37(13): 3031-3037.
- ALVES PEREIRA, A.H.; TIRAPELLI, C.; RODOLPHO, L.A. (2010). Ultrasonic dental scaler performance assessment with an innovative cavitometer, en: *American Journal of Applied Sciences*, 7(3):290-300.
- ANTONIADIS, A.; POULIOS, I.; NIKOLAKAKI, E.; MANTZAVINOS, D. (2007). Sonochemical disinfection of municipal wastewater, en: *Journal of Hazardous Material*, 146(3):492-495.
- APHA, AWWA; WPCF (1992). *Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos.
- AREND, K.K.; BELETSKY, D.; DE PINTO, J.V.; LUDSIN, S.A.; ROBERTS, J.J.; RU-

- CINSKI, D.K., *et al.* (2011). Seasonal and interannual effects of hypoxia on fish habitat quality in central Lake Erie, en: *Freshwater Biology*, 56(2):366-383.
- BAUER, M.J.; BAYLEY, R.; CHIPPS, M.J.; EADES, A.; SCRIVEN, R.J.; RACHWAL, A.J. (1998). Enhanced rapid gravity filtration and dissolved air flotation for pre-treatment of river Thames reservoir water, en: *Water Science and Technology*, 37(2):35-42.
- BENZINGER, W.; SCHYGULLA, U.; JÄGER, M.; SCHUBERT, K. (2005). Anti fouling investigations with ultrasound in a microstructured heat exchanger (pp: 197 – 201) En: *Proceedings of 6th International Conference on Heat Exchanger Fouling and Cleaning*, Kloster Irsee, Germany, 5-10/06/2005.
- BLUME, T.; NEIS, U. (2004). Improved wastewater disinfection by ultrasonic pre-treatment, en: *Ultrasonics Sonochemistry*, 11(5):333-336.
- BOTT, T.R. (1998). Techniques for reducing the amount of biocide necessary to counteract the effects of biofilms growth in cooling water systems, en: *Applied Thermal Engineering*, 18(11):1059-1066.
- BOTT, T.R. (2001). Potential physical methods for the control of biofouling in water systems, en: *Chemical Engineering Research and Design*, 79(4):484-490.
- BOTT, T.R.; TIANQING, L. (2004). Ultrasound enhancement of biocide efficiency, en: *Ultrasonics Sonochemistry*, 11(5):323-326
- BROEKMAN, S.; POHLMANN, O.; BEARDWOOD, E.S.; CORDEMANS DE MEULENAER, E. (2010). Ultrasonic treatment for microbiological control of water systems, en: *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(6):1041-1048.
- CARMICHAEL, W.W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins, en: *Journal of Applied Bacteriology*, 72(6):445-459.
- CARPENTER, S.R. (1981). Submersed vegetation: an internal factor in lake ecosystem succession, en: *The American Naturalist*, 118(3):372-383.
- CARPENTER, S.R.; CARACO, N.F.; CORELL, D.L.; HOWART, R.W.; SHARPLEY, A.N.; SMITH, V.H. (1998). Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen, en: *Ecological Applications*, 8(3):559-568.
- CHEMAT, F.; TEUNISSEN, P.G.M.; CHEMAT, S.; BARTELS, P.V. (2001). Sono-oxidation treatment of humic substances in drinking water, en: *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(3):247-250.
- CLARET, M.; LEIZ, E.; RAMO, P.; DE LA SIERRA, P.; KIEFFER, L.A. (2012). Degradación de microcistina-LR mediante ultrasonido: efecto de la temperatura y el pH. (sin paginar). En: *XXIX Congreso Argentino de Química*, Mar del Plata, 3-5/10/2012.
- DIAZ, R.J.; ROSENBERG, R. (2008). Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems, en: *Science*, 321(5891):926-929.
- DODDS, W.K.; BOUSKA, W.W.; EITZMANN, J.L.; PILGER, T.J.; PITTS, K.L.; RILEY, A.J. *et al.* (2009). Eutrophication of U.S. freshwaters: analysis of potential economic damages, en: *Environmental Science and Technology* 43(1):12-19.
- DOSTI, M.R.; KARGAR, R. SAYADI, M.H. (2012). Water treatment using ultrasonic

- assistance: A review, en: *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 2(2):96-110.
- DRAKOPOULOU, S.; TERZAKIS, S.; FOUNTOUKAKIS, M.S.; MANTZAVINOS, D.; MANIOS, T. (2009). Ultrasound-induced inactivation of gram-negative and gram-positive bacteria in secondary treated municipal wastewater, en: *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(5):629-634.
- GALLOWAY, J.N.; SCHLESINGER, W.H.; LEVY, H.; MICHAELS, A.; SCHNOOR, J.L. (1995). Nitrogen fixation: anthropogenic enhancement-environmental response, en: *Global Biogeochemical Cycles*, 9(2):235-252.
- GOGATE, P.R. (2007). Application of cavitation reactors for water disinfection: Current status and path forward, en: *Journal of Environmental Management*, 85(4):801-815.
- GONZALEZ-LABRADA, K.; QUESADA-PEÑATE, I.; JULCOUR-LEBIGUE, C.; DELMAS, H.; CRUZ GONZÁLEZ, G.; JÁUREGUI-HAZA, U.J. (2010). El empleo del ultrasonido en el tratamiento de aguas residuales, en: *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 41:1-11.
- GUO, Z.; GU, C.; ZHENG, Z.; FENG, R.; JIANG, F.; GAO, G., et al. (2006). Sono-degradation of halomethane mixtures in chlorinated drinking water, en: *Ultrasonics Sonochemistry*, 13(6):487-492.
- HAO, H.; WU, M.; CHEN, Y.; TANG, J.; WU, Q. (2004). Cavitation mechanism in cyanobacterial growth inhibition by ultrasonic irradiation, en: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 33(3-4):151-156.
- HENDERSON, R.K.; BAKER, A.; PARSONS, S.A.; JEFFERSON, B. (2008). Characterization of algogenic organic matter extracted from cyanobacteria, green algae and diatoms, en: *Water Research*, 42(13):3435-3445.
- HENG, L.; JUN, N.; WEN-JIE, H.; GUIBAI, L. (2009). Algal removal by ultrasonic irradiation-coagulation, en: *Desalination*, 239(1-3):191-197.
- HUDDER, A.; SONG, W.; O'SHEA, K.E.; WALSH, P.J. (2007). Toxicogenomic evaluation of microcystin-LR treated with ultrasonic irradiation, en: *Toxicology and applied pharmacology*, 220(3):357-364.
- IZAGUIRRE, G.; HWANG, C.J.; KRASNER, S.W.; MCGUIRE, M.J. (1982). Geosmin and 2-methylisoborneol from cyanobacteria in three water supply systems, en: *Applied and Environmental Microbiology*, 43(3):708-714.
- JACHLEWSKI, S.; BOTES, M.; CLOETE, T.E. (2013). The effect of ultrasound at 256 KHz on *Microcystis aeruginosa*, with and without gas vacuoles, en: *Water SA*, 39(1):171-174.
- JOYCE, M.J.; WU, X.; MASON, T.J (2010). Effect of ultrasonic frequency and power on algae suspensions, en: *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering*, 45(7):863-866.
- KIEFFER, L.A. (2000). Modelo dinámico de eutroficación. Tesis para obtener el Grado Académico de Magister en Química. Santa Fe: Univ.Nac. del Litoral. [Inédita].
- KIEFFER, L.A.; GARCIA DE EMILIANI, M.O.; ARGUELLO, M.D.; SANSEVERINO, C.B. (2000a). Eutroficación del Lago del Parque Belgrano (Santa Fe) I. Modelo estadístico (pp.161-168). En: *Actas de las III Jornadas Nacionales de Geografía Física*.

- KIEFFER, L.A.; GARCIA DE EMILIANI, M.O.; ARGUELLO, M.D.; SANSEVERINO, C.B. (2000b). Eutroficación del Lago del Parque Belgrano (Santa Fe) II. Modelo dinámico. (pp.147-152). En: *Actas de las III Jornadas Nacionales de Geografía Física*,
- KOTOPOULIS, S.; SCHOMMARTZ, A.; POSTEMA, M. (2009). Sonic cracking of blue-green algae, en: *Applied Acoustics*, 70(10):1306-1312.
- LEE, T.J.; NAKANO, K.; MATSUMURA, M. (2002). A novel strategy for cyanobacterial Bloom control by ultrasonic irradiation, en: *Water Science & Technology*, 46(6-7):207-215.
- LEHTINIEMI, M.; ENGSTROM-OST, J.; VIITASALO, M. (2005). Turbidity decreases anti-predator behaviour in pike larvae, *Esox Lucius*, en: *Environmental Biology of Fishes*, 73(1):1-8.
- MA, B.; CHEN, Y.; HAO, H.; WU, M.; WANG, B.; LV, H., *et al.* (2005). Influence of ultrasonic field on microcystins produced by bloom-forming algae, en: *Colloids and Surf B Biointerfaces*, 41(2):197-201.
- MAEZAWA, A.; NAKADOI, H.; SUZUKI, K.; FURUSAWA, T.; SUZUKI, Y.; UCHIDA, S. (2007). Treatment of dye wastewater by using photo-catalytic oxidation with sonication, en: *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(5):615-620.
- MAHVI, A.H. (2009). Application of Ultrasonic Technology for water and wastewater treatment, en: *Iranian Journal of Public Health*, 38(2):1-17.
- MAHVI, A.H.; DEHGHANI, M.H. (2005). Evaluation of Ultrasonic Technology in Removal of Algae from Surface Waters, en: *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8(10):1457-1459.
- MASON, T.J. (2012). Trends in sonochemistry and ultrasonic processing, en: *AIP Conference Proceedings*, 1433(1):21-26.
- MASON, T.J.; COBLEY, A.J.; GRAVES, J.E.; MORGAN, D. (2011). New evidence for the inverse dependence of mechanical and chemical effects on the frequency of ultrasound, en: *Ultrasonics Sonochemistry* 18(1):226-230.
- MATILAINEN, A.; SILLANPAA, M. (2010). Removal of natural organic matter from drinking water by advanced oxidation processes, en: *Chemosphere*, 80(4):351-365.
- NADEO, V.; LANDI, M.; BELGIORNO, V.; NAPOLI, R.M.A. (2009). Wastewater disinfection by combination of ultrasound and ultraviolet irradiation, en: *Journal of Hazardous Materials*, 168(2-3):925-929.
- NAKANO, K.; LEE, T.J.; MATSUMURA, M. (2001). In Situ Algal Bloom Control by the Integration of Ultrasonic Radiation and Jet Circulation to Flushing, en: *Environmental Science & Technology*, 35(24):4941-4946.
- NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. (2000). Section 7- Discussion of the mechanical index and other exposure parameters. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2000332/pdf/nih>, Consulta: 13/04/2012
- NATO – UNDERSEA RESEARCH CENTRE (2006) Human Diver and Marine Mammal Risk Mitigation Rules and Procedures. NURC-SP-2006-008.27 pág.
- O'DALY, B.; MORRIS, E.; GAVIN, G.; O'BYRNE, J.; MCGUINNESS, G. (2008). High-power low-frequency ultrasound: a review of tissue dissection and ablation

- in medicine and surgery, en: *Journal of Materials Processing Technology*, 2000(1-3):38-58.
- PETERSON, R.V.; PITT, W.G. (2000). The effect of frequency and power density on the ultrasonically-enhanced killing of bio-film-sequestered *Escherichia coli*, en: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 17(4):219-227.
- PITTOIS, S.; JACKSON, M.H.; WOOD, B.J.B. (2000). Problems associated with the presence of cyanobacteria in recreational and drinking waters, en: *Int. J. Environ. Health Res.*, 10(3):203-218.
- RAJASEKHAR, P.; FAN, L.; NGUYEN, T.; RODDICK, F.A. (2012a). Impact of sonication at 20 kHz on *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena circinalis* and *Chlorella sp.*, en: *Water Research*, 46(5):1473-1481.
- RAJASEKHAR, P.; FAN, L.; NGUYEN, T.; RODDICK, F.A. (2012 b). A review of the use of sonication to control cyanobacterial bloom, en: *Water Research*, 46(14):4319-4329.
- RODRIGUEZ-MORALES, A.; DICKSON, S.; HOBSON, P.; HOWARD, C. ZANDER, A.; BURCH, M. (2014). Quantification of the ultrasound induced sedimentation of *Microcystis aeruginosa*, en: *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(4):1299-1304.
- SCHINDLER, D.W. (2006). Recent advances in the understanding and management of eutrophication, en: *Limnology and Oceanography*, 51(1, part 2):356-363.
- SHI, J.; HAN, X.; ZHU, Z.; DENG, H. (2012). Identification of cytotoxicity intermediate products and degradation pathways for microcystins using low-frequency ultrasonic irradiation, en: *Water, Air and Soil Pollution*, 223(8):5027-5038.
- SHOW, K.Y.; MAO, T.; LEE, D.J. (2007). Optimization of sludge disruption by sonication, en: *Water Research*, 41(20):4741-4747.
- SMITH, V.H.; SCHINDLER, D.W. (2009). Eutrophication science: where do we go from here?, en: *Trends in Ecology and Evolution* 24(4):201-207.
- SONG, W.; TESHIBA, T.; REIN, K.; O'SHEA, K.E. (2005). Ultrasonically induced degradation and detoxification of microcystin-LR (cyanobacterial toxin), en: *Environmental Science & Technology*, 39(16):6300-6305.
- SONG, W.; DE LA CRUZ, A.A.; REIN, K.; O'SHEA, K.E. (2006). Ultrasonically induced degradation of microcystin-LR and -RR: Identification of products, effect of pH, formation and destruction of peroxides, en: *Environmental Science & Technology*, 40(12):3941-3946.
- SRISUKSOMWONG, P.; WHANGCHAI, N.; YAGITA, Y.; OKADA, K.; PEERAPORN-PISAL, Y.; NOMURA, N. (2011). Effects of ultrasonic irradiation on degradation of microcystin in fish ponds, en: *International Journal of Agriculture & Biology*, 13(1):67-70.
- SUSLICK, K.S. (1990). Sonochemistry, en: *Science*, 247(4949):1439-1445.
- TANG, J.W.; WU, Q.Y.; HAO, H.W.; CHEN; WU, M. (2004). Effect of 1.7 MHz ultrasound on a gas-vacuoles cyanobacterium and a gas-vacuole negative cyanobacterium, en: *Colloids Surf B Biointerfaces*, 36(2):115-121.
- THOMPSON, L.H.; DORAISWAMY, L.K. (1999). Sonochemistry: science and engineering, en: *Ind. Eng. Chem. Res.*, 38(4):1215-1249.

- TURNER, A.M.; CHISLOCK, M.F. (2010). Blinded by the stink: nutrient enrichment impairs the perception of predation risk by freshwater snails, en: *Ecological Applications*, 20(8):2089-2095.
- UTERMÖHL, H. (1958). Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton Methodik, en: *Mitt. Int. Ver. Limnol.*, 9:1-38.
- VAN DEN HOEK, C.; MANN, D.; JAHNS, H.M. (1995). Chlorophyta (green algae). (pp. 300-330). En: VAN DEN HOEK, C.; MANN, D.; JAHNS, H.M. *Algae: An Introduction to Phycology*. Cambridge: Cambridge University Press.
- VITOUSEK, P.M.; MOONEY, H.A.; LUBCHENKO, J.; MELILLO, J.M. (1997a). Human domination of Earth's ecosystems, en: *Science*, 277(5325):494-499.
- VITOUSEK, P.M.; ABER, J.; HOWARTH, R.W.; LIKENS, G.E.; MATSON, P.A.; SCHINDLER, D.W., *et al.* (1997b). Human alteration of the global nitrogen cycle: causes and consequences, en: *Ecological Applications* 7(3):737-750.
- WANG, M.; YUAN, W.; JIANG, X.; JING, Y.; WANG, Z. (2014). Disruption of microalgal cells using high-frequency focused ultrasound, en: *Bioresource Technology*, 153:315-321.
- WILSON, A.E. SARNELLE, O; TILLMANN, A.R. (2006). Effects of cyanobacterial toxicity and morphology on the population growth of freshwater zooplankton: meta-analyses of laboratory experiments, en: *Limnology and Oceanography*, 51(4):1915-1924.
- WINER, R.J. (1971). *Statistical principles in experimental design*. McGraw-Hill Book, New York. 907 pag.
- WU, X.; JOYCE, E.M.; MASON, T.J. (2011). The effects of ultrasound on cyanobacteria, en: *Harmful Algae*, 10(6):738-743.
- 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, en: *Water Research*, 46(9):2851-2858.
- YANG, Z.; KONG, F.X.; SHI, X.L.; ZHANG, M.; CAO, H.S. (2008). Grazing effect of *Ochromonas sp.* On morphological and physiological characteristics of *Microcystis aeruginosa*, en: *Journal of Lake Science*, 20(4):403-408.
- YU, G.; ZHAO, C.; LIU, B.; LI, Q.; GAO, H. (2013). Removal of algae from raw water by ultrasonic irradiation and flocculation: a pilot scale experiment, en: *Journal of Environmental Biology*, 34(2):331-335.
- ZHANG, G.; ZHANG, P.; WANG, B.; LIU, H. (2006a). Ultrasonics frequency effects on the removal of *Microcystis aeruginosa*, en: *Ultrasonics Sonochemistry*, 13(5):446-450.
- ZHANG, G.; ZHANG, P.; WANG, B.; LIU, H. (2006b). Ultrasonics damage on cyanobacterial photosynthesis, en: *Ultrasonics Sonochemistry*, 13(6):501-505.
- ZHANG, D.L.; YU, G.Z. (2007). Treatment of *Microcystis aeruginosa* in eutrophic raw water with NaOCl and H₂O₂, en: *Journal of Hennan University (Natural Science)*, 37:245-248.
- ZHANG, G.; ZHANG, P.; FAN, M. (2009). Ultrasound-enhanced coagulation for *Microcystis aeruginosa* removal, en: *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(3):334-338.