

**EQUIPO EDITORIAL****DIRECCIÓN****Dr. Jorge Silveira**

Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Uruguay

**CONSEJO EDITORIAL****Dra. Sofía Barrios**Universidad de la República (UdelaR), Facultad de Ingeniería,  
Instituto de Ingeniería Química, Uruguay**MBA. Ing Mariela De Giuda**Gerente de Tecnología y Gestión, Laboratorio Tecnológico  
del Uruguay (LATU), Uruguay**Dr. Andrés Dieste**Universidad de la República (UdelaR), Facultad de  
Ingeniería, Instituto de Ingeniería Química, Uruguay**Dr. Gustavo Domínguez**

Gerente de Latitud - Fundación LATU, Uruguay

**Dra. Gabriela Eguren**Universidad de la República (UdelaR), Facultad de Ciencias,  
Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales, Uruguay**PhD. Federico Harte**Profesor adjunto de Food Science, Penn State University,  
Estados Unidos**MSc. Rosa Márquez**

Latitud - Fundación LATU, Uruguay

**Dr. Eduardo Méndez**Universidad de la República (UdelaR), Facultad de Ciencias,  
Instituto de Química Biológica, Uruguay**PhD. Laura Moya Silva**

Universidad ORT Uruguay, Facultad de Arquitectura, Uruguay

**Dr. Daniel Vázquez**

INIA La Estanzuela, Plataforma de Agroalimentos, Uruguay

**MSc. Daniel Volpe**

Gerente de Análisis, Ensayo y Metrología, Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Uruguay

**EDICIÓN****Carla Rizzotto**

Edición revista INNOTEC, Centro de Información Técnica, Laboratorio Tecnológico del Uruguay-LATU, Uruguay

**ADMINISTRACIÓN DE OJS Y GESTIÓN DE INFORMACIÓN****Lic. Lorena Fiori**

Centro de Información Técnica. Laboratorio Tecnológico del Uruguay-LATU, Uruguay

**IMPLEMENTACIÓN, HOSTING Y SOPORTE DE OJS**

Luis Ramírez Caldas, Bibliolatino

**ACERCA DE INNOTEC**

**INNOTEC** es una publicación arbitrada en modalidad doble ciego por un comité independiente de revisores externos a su entidad editora, el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU).

Editada en Montevideo (Uruguay), bajo la modalidad de publicación continua, contiene artículos originales inéditos y su periodicidad es semestral (enero-junio y julio-diciembre).

El objetivo de la revista es la divulgación y transferencia del conocimiento en las áreas de Forestales, Medio Ambiente, Metrología y Tecnología Alimentaria.

INNOTEC está dirigida a académicos, investigadores y técnicos de la comunidad científica uruguaya e internacional.

INNOTEC se encuentra indexada en las siguientes bases de datos: DOAJ, EBSCOhost Academica Premier, Latindex, Redalyc y REDIB.



Somos miembros de:

Asociación Uruguaya de Revistas Académicas AURA



La colección completa se puede consultar en línea en

<http://ojs.latu.org.uy/index.php/INNOTEC/index>

Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional.

Los conceptos y opiniones vertidas en los artículos aquí publicados, así como el uso que otros puedan hacer de ellos, son de responsabilidad exclusiva de los autores y no reflejan el punto de vista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay.

### **INNOTEC - NÚMERO 22**

**Julio-diciembre de 2021**

ISSN electrónico: 1688-6593

Título clave: INNOTEC (En línea)

Título clave abreviado: Innotec (En línea)

Centro de Información Técnica, LATU

Av. Italia 6201. Tel. (598) 2601 3724,

internos 1314 y 1350

[innotec@latu.org.uy](mailto:innotec@latu.org.uy)

<http://www.latu.org.uy>

<http://ojs.latu.org.uy>

### **DISEÑO Y ARMADO**

(tapa, figuras, tablas, ecuaciones, páginas preliminares y número completo)

**Happen Marketing**

[Hola@happenmarketing.com](mailto:Hola@happenmarketing.com)

<http://happenmarketing.com>

En esta edición se incluyen los artículos “Interacciones entre el mejillón dorado y macroinvertebrados bentónicos nativos del Río Uruguay” y “Variación anual de larvas del mejillón dorado (*Limnoperna fortunei*) en sistemas de refrigeración de centrales hidroeléctricas en embalses del Río Negro, Uruguay”, y las revisiones

“Pinturas antiincrustantes derivadas de plantas terrestres: una solución segura para el medio ambiente en el control de la bioincrustación” y “Control del agua de lastre como fuente de ingreso de especies exóticas invasoras en puertos argentinos de la Cuenca del Plata”, basados en investigaciones cuyos resúmenes fueron presentados en el Simposio “Ecología y manejo del molusco invasor *Limnoperna fortunei* (mejillón dorado) en Uruguay”, que se llevó adelante el 17 de diciembre en 2019, organizado por Oceanografía y Ecología Marina, Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

## SUMARIO

### Artículos

**Monitoreo de calidad de agua y predicción de coliformes fecales en playas de Montevideo mediante algoritmos de aprendizaje automático**  
e555 **Water quality prediction using machine learning algorithms in recreational beaches from Montevideo, Uruguay**  
Ángel Segura, Lía Sampognaro, Guzmán López, Carolina Crisci, Mathías Bourel, Victoria Vidal, Karina Eirin, Claudia Piccini, Carla Kruk, Gonzalo Perera

**Las floraciones de cianobacterias tóxicas comprometen el uso del agua del Río Negro, Uruguay**  
e577 **Toxic cyanobacterial blooms compromise the use of the Río Negro water, Uruguay**  
Sylvia Bonilla, Luis Aubriot, Signe Haakonsson, Mariana Illarze, Ismael Díaz Isasa, Beatriz M. Brena

**Efecto de la radiación UV-C sobre la calidad y la flora fúngica contaminante natural de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L., variedad O'Neil)**  
e575 **Effect of UV-C radiation on the quality and contaminating fungal flora of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L., variety O'Neal)**  
Laura Noemí Frisón, María Zoé Rivas, Carolina Andrea Chiericatti, Andrea Marcela Piagentini

**Interacciones entre el mejillón dorado y macroinvertebrados bentónicos nativos del Río Uruguay**  
e573 **Interactions between the golden mussel and native benthic macroinvertebrates of Uruguay River**  
Ivana Silva, Ernesto Brugnoli, Cristhian Clavijo, Alejandro D'Anatro, Daniel E. Naya, Franco Texeira de Mello, Giancarlo Tesitore, Iván González-Bergonzoni

**Variación anual de larvas del mejillón dorado (*Limnoperna fortunei*) en sistemas de refrigeración de centrales hidroeléctricas en embalses del Río Negro, Uruguay**

e572 **Annual variation of golden mussel larvae (*Limnoperna fortunei*) in refrigeration systems of hydroelectric power plants in Río Negro reservoirs, Uruguay**

Daniel Fabián, Carolina Ferrer, Jennifer Pereira, Pablo Muniz, Leandro Capurro, Magdalena Mandiá, Guillermo Failache, Ernesto Brugnoli

## Revisiones

**Pinturas antiincrustantes derivadas de plantas terrestres: una solución segura para el medio ambiente en el control de la bioincrustación**

e559 **Antifouling paints derived from terrestrial plants: a safe solution for the environment in the control of biofouling**

Vanessa Ochi Agostini, Grasiela Lopes Leães Pinho, Erik Muxagata, Alexandre José Macedo, Fabiana Rey Bentos, Lucía Boccardi, María Jesús Dabezies, Ernesto Brugnoli Oliveira

**Control del agua de lastre como fuente de ingreso de especies exóticas invasoras en puertos argentinos de la Cuenca del Plata**

e565 **Control of ballast water as a source of invasive exotic species in Argentine ports of the River Plate Basin**

Mariana Abelando

**Producción, nutrientes, eutrofización y cianobacterias en Uruguay: armando el rompecabezas**

e558 **Production, nutrients, eutrophication and cyanobacteria blooms in Uruguay: putting puzzle pieces together**

Guillermo Goyenola, Carla Kruk, Néstor Mazzeo, Alejandro Nario, Carlos Perdomo, Claudia Piccini, Mariana Meerhoff

## Notas técnicas

**MCM Alchimia Methods: solved examples on computer-aided uncertainty quantification**

e547 **Metodología de MCM Alchimia: ejemplos resueltos de estimación de incertidumbre asistida por computadora**

Luis Pablo Constantino

## POLÍTICA EDITORIAL DEL LATU

La actividad editorial del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) tiene como finalidad la difusión en la comunidad académica y profesional uruguaya de las investigaciones que apoyen el desarrollo de tecnologías y modelos de gestión que aporten valor a los procesos de innovación.

### Misión

Nuestra misión es la publicación de trabajos originales, con un enfoque de rigor y calidad teórica y metodológica, que contribuyan a la producción sistemática de nuevo conocimiento científico tecnológico y al fortalecimiento de la presencia uruguaya en redes regionales e internacionales.

Es de interés del LATU consolidar el campo de la documentación científica a nivel local mediante la creación e innovación de productos editoriales.

### Los objetivos específicos son:

- Promover la publicación de investigaciones de excelencia en las áreas de conocimiento estratégicas del LATU, alineadas a su misión como impulsor del desarrollo sustentable del país y su inserción internacional a través de la innovación.
- Posicionar a los autores, técnicos y colaboradores en las plataformas electrónicas internacionales, estimulando su participación en el marco de un proceso de edición arbitrado por especialistas.
- Contribuir al desarrollo y transferencia de tecnologías de innovación orientadas a la mejora de procesos industriales, empresariales y sociales.
- Aportar y divulgar conocimiento científico de calidad a los técnicos, académicos, investigadores y a la sociedad en su conjunto, tanto para la efectiva transmisión de las experiencias como para el crecimiento profesional.
- Facilitar el intercambio y la creación de nuevo conocimiento entre instituciones.

Invitamos a los autores interesados en publicar en INNOTECH a ingresar a nuestra página en la plataforma Open Journal Systems (<http://ojs.latu.org.uy>) o a contactarse con el Centro de Información Técnica del LATU a través del correo electrónico [innotec@latu.org.uy](mailto:innotec@latu.org.uy) para recibir instrucciones para el envío de artículos a nuestro proyecto editorial.

## CÓDIGO ÉTICO DE INNOTECH

La revista INNOTECH adhiere a los principios publicados por COPE (Committee on Publication Ethics) en <https://publicationethics.org/resources/code-conduct> y

promueve así la conducta ética de todos los participantes del proceso editorial: autores, revisores y equipo editorial.

**Los autores se comprometen a:**

- Enviar artículos originales, de su autoría y que no infrinjan derechos de propiedad intelectual y/o derecho de imagen y/o de datos personales de terceros, e inéditos, que no hayan sido presentados simultáneamente a otra publicación.
- Asegurar la veracidad de los datos presentados en su investigación.
- Asegurar la integridad de su investigación, evitando la publicación de resultados parciales.
- Consignar a los autores en base al nivel de responsabilidad intelectual que han tenido en la elaboración del artículo, en orden decreciente, sin que medien otros criterios jerárquicos.
- Designar un autor de correspondencia, que asume la responsabilidad de difundir entre todos los autores los avances y resultados del proceso editorial.
- Identificar debidamente las fuentes originales de los trabajos que cita en su artículo.
- Revisar los antecedentes de otras investigaciones del ámbito teórico inmediato de su trabajo para dar cuenta de la información más actualizada y relevante.
- Reconocer los apoyos académicos, financieros y logísticos que hicieron posible la investigación y/o la elaboración del artículo.

**Los revisores se comprometen a:**

- Declarar que no existe conflictos de interés para la evaluación de un artículo.
- Realizar su evaluación respondiendo a criterios objetivos y respetando su independencia académica.
- Asegurar la confidencialidad tanto del contenido del artículo como del resultado de su evaluación.
- Preservar el anonimato en todo el proceso, apelando al editor como intermediario de cualquier comunicación con los autores.
- Respetar los tiempos acordados con los editores de la revista para la realización de su trabajo.

**El equipo editorial se compromete a:**

- Asegurar la honestidad y transparencia de todo el proceso editorial, desde la presentación del artículo, evaluación por pares y publicación en las condiciones pautadas.
- Seleccionar los revisores idóneos para cada trabajo.
- Garantizar la independencia de criterio de los revisores en el ejercicio de su rol.

- Asegurar el anonimato de todas las partes involucradas en el proceso de arbitraje por pares.
- Mediar en posibles conflictos de interés con el apoyo del consejo editorial.
- Velar por el cumplimiento de los plazos acordados en cada fase del proceso.
- Difundir los números publicados en las redes académicas y bases bibliográficas de su entorno local y regional.
- Controlar el cumplimiento de los requisitos por parte de los autores y la actuación acorde de los árbitros.
- Identificar casos de incumplimiento de los compromisos éticos enumerados en este código y penalizar a sus responsables con sanciones que van de la suspensión del infractor en su rol en el proceso editorial a la difusión de una rectificación pública y la remoción del artículo.

## INSTRUCCIONES A LOS AUTORES PARA PUBLICAR EN INNOTEC

### Ámbito de los artículos y proceso de revisión

INNOTEC publica artículos originales inéditos en español e inglés. Los campos temáticos que aborda responden a las áreas estratégicas de investigación del LATU: Forestales, Medio Ambiente, Metrología y Tecnología Alimentaria. Esta publicación semestral arbitrada por un comité de revisores externos recopila las investigaciones realizadas en el marco de distintos proyectos y procesos de transferencia de conocimiento para el desarrollo de sistemas innovadores, productivos y de investigación.

Las publicaciones editadas por el Centro de Información Técnica son gestionadas en Open Journal Systems, software para la gestión del proceso editorial, desarrollado, soportado y libremente distribuido por el Public Knowledge Project bajo licencia pública general GNU.

INNOTEC no cobra cargos de ningún tipo por el envío de originales ni por su procesamiento.

El tiempo estimado para los procesos de evaluación y publicación es de 8 a 12 semanas.

El proceso de envío de artículos para la revista incluye los siguientes pasos:

(a) Ingreso por parte del autor del artículo completo en el sistema utilizado por el Centro de Información Técnica para la edición de sus publicaciones en la web:

<http://ojs.latu.org.uy>.

(b) Por medio del sistema se notifica al autor la recepción del artículo y su eventual publicación. En

este paso se considera la originalidad del trabajo y se priorizan aquellos de áreas estratégicas y temáticas nacionales.

- (c) Una vez aprobado por el Consejo editorial de la revista, el artículo es enviado a proceso de arbitraje.
- (d) Se asignan los árbitros, independientes y externos, quienes evaluarán el desarrollo específico del manuscrito, tanto en sus aspectos temáticos como metodológicos.
- (e) Devuelto el informe de arbitraje, el editor se comunica con el/los autor/es en respuesta de los comentarios que hace el evaluador del artículo. En caso de ser necesario habrá otras rondas de evaluación.
- (f) Se edita el artículo aplicando en el texto las normas del Manual de estilo del LATU y se envía la última versión diseñada al/los autor/es para su aprobación final.

Para poder incluir artículos completos, se debe considerar que estos no tengan derechos de autor otorgados a terceros a la fecha de envío y que no se hayan presentado a otras publicaciones simultáneamente. Los artículos son publicados en OJS y se distribuyen bajo la modalidad de acceso abierto. Los derechos autorales son protegidos por Creative Commons (CC) Atribución- NoComercial 4.0 Unported. Al ingresar al sistema <https://ojs.latu.org.uy/inicio/> los autores deberán aceptar la nota de copyright en la que se asumen los términos de responsabilidad, se reconoce la licencia CC y se establece el compromiso a realizar la cita completa de la edición institucional de esta primera publicación del artículo en sus siguientes publicaciones –completas o parciales– efectuadas en cualquier otro medio de divulgación, impreso o electrónico. Los autores están autorizados a realizar una publicación simultánea en sistemas de autoarchivo o repositorios institucionales. Los conceptos y opiniones vertidos en los artículos publicados y el uso que otros puedan hacer de ellos son de responsabilidad de sus autores. Esta responsabilidad se asume con la sola publicación del artículo enviado. El LATU se reserva el derecho de publicar aquellos artículos que responden a las áreas estratégicas fijadas por la organización para cada edición y de realizar modificaciones que considere favorables a la óptima presentación de los contenidos en la revista.

## **PROCESO DE REVISIÓN**

El arbitraje de esta revista se realiza por pares y bajo modalidad doble ciego, por lo que autores y árbitros permanecen anónimos a lo largo de todo el proceso. El arbitraje es el proceso de evaluación crítica especializada de un manuscrito por parte de pares idóneos que operan en el área temática que dicho texto desarrolla. Cada artículo es revisado por un mínimo de dos árbitros. Los comentarios y recomendaciones de los evaluadores son un insumo determinante para la aceptación o rechazo de un manuscrito en el proceso editorial de publicaciones técnicas del LATU; no obstante, el equipo editor es responsable de la decisión final de publicación o rechazo de un artículo y de la notificación al autor de contacto.

El comité técnico de arbitraje de INNOTEC es un cuerpo de especialistas técnicos seleccionados por su grado de especialización, prestigio académico y experiencia profesional y editorial. Nuestros árbitros cumplen la vital función de evaluar el desarrollo específico del contenido de las publicaciones, tanto en sus aspectos temáticos como metodológicos, guiados por un formulario de revisión que una vez completo es presentado a los autores del artículo.

Los autores cuentan con un plazo de siete días para la devolución del artículo corregido según las recomendaciones de los árbitros.

## **NORMAS DE PRESENTACIÓN Y ENVÍO DE LOS TEXTOS**

Para que el artículo sea considerado para su publicación, debe cumplir con las siguientes normas de presentación. Ante cualquier consulta diríjase al correo electrónico de referencia [innotec@latu.org.uy](mailto:innotec@latu.org.uy).

Para el correcto envío de su artículo, siga las instrucciones que se indican en OJS. Recuerde completar todos los datos del artículo, entre ellos: título, autores, filiación, resumen y palabras clave.

Nota: Los nombres completos de los autores deberán ser incluidos en los metadatos en la forma en la que se solicitan en OJS, pero omitidos en el documento Word del artículo, primera medida para asegurar la integridad de la revisión ciega.

### **DEFINICIONES:**

**Autor.** Persona o colectividad responsable del contenido intelectual del documento.

**Título.** Refleja el contenido del texto con precisión, es neutro e informativo.

**Resumen.** Provee información específica. Sintetiza, anuncia y jerarquiza contenidos.

**Introducción.** Incluye antecedentes concretos y datos del proceso, enumeración de objetivos e importancia del tema.

**Materiales y métodos.** Relato de los métodos y procedimientos que permitieron obtener los resultados presentados. Obtención del material, condiciones y metodología. Análisis estadísticos, programas.

**Resultados.** Presentación y expresión de los hallazgos en tablas, gráficos y/o figuras.

**Discusión y conclusiones.** Síntesis de los avances y las contribuciones más relevantes de la investigación. En esta sección se discuten los resultados en el orden en el que fueron presentados. Asimismo, se define y diferencia claramente el aporte del trabajo con respecto al conocimiento previo. Si procede, se mencionan posibles líneas futuras de investigación y de aplicación de los resultados.

**Reconocimientos.** Breve agradecimiento a quienes colaboraron en la producción del artículo y/o que permitieron el desarrollo de la investigación.

**Referencias.** Referencias al material bibliográfico consultado para la elaboración del artículo.

## **LOS ARTÍCULOS DEBEN PRESENTAR:**

**Título del artículo** en mayúsculas y minúsculas, en inglés, español y portugués.

**Nombre completo de todos los autores** (solo en metadatos de OJS), ingresados en orden

decreciente según el grado de responsabilidad en el desarrollo del artículo, sin que medien jerarquías

funcionales. Indicar la sección o departamento al que pertenecen y empresa de la que forman parte. Se debe señalar además el autor de contacto para las comunicaciones electrónicas subsiguientes. Los autores deberán contar con un número de registro en ORCID, que se consigna en OJS al ingresar los autores en metadatos. Para más información sobre ORCID y su relevancia para los autores puede consultar esta página: <https://orcid.org/>.

**Resumen** en inglés, español y portugués, de 200 palabras máximo en su versión castellana.

**Palabras clave**, en inglés, español y portugués, de dos a cinco, las cuales no deben repetir los términos ya utilizados en el título.

**Texto** de tres (3) a veinticinco (25) páginas de desarrollo (introducción, métodos, descripción de equipos, descripción de programas, desarrollo de teorías, resultados y discusión, conclusiones, referencias, tablas, figuras e imágenes, (ver sección Estilo y formato de citas y referencias en este documento). El texto deberá ser presentado en fuente Arial 11, a espacio doble y con numeración de líneas, con títulos en mayúsculas y minúsculas y en formato.doc, de cualquier versión de Microsoft Word.

**Secciones.** Los títulos de sección (que señalan Introducción, Materiales y Métodos, Discusión, etc.)

deben ser escritos en mayúscula y minúsculas, estilo de fuente bold y centrados en el texto. Los subtítulos serán justificados a la izquierda, escritos en mayúscula y minúsculas, también en bold. Tanto la primera letra del título y la primera letra de los nombres propios deben ser escritas en mayúscula. Se debe dejar un espacio entre líneas antes y después de cada subtítulo.

**Fórmulas, figuras, tablas e imágenes.** Las figuras deben numerarse correlativamente en orden de aparición en el texto, y deben incluir un breve título explicativo en el margen inferior a las mismas. Si es necesario incluir fotos o imágenes, éstas se deben designar como figuras. Las fotos deben ser nítidas y enviadas en formato jpg (mínimo 300 px aseguran una buena calidad de impresión). Las tablas deben ser numeradas correlativamente y en forma independiente de las figuras, y cada entrada debe ocupar su propia celda. Se deben numerar según el orden de aparición en el texto, incluyendo un título explicativo en la parte superior de la tabla. Evitar utilizar líneas verticales y en la medida de lo posible no incluir más de dos tablas por carilla, no dividir tablas en más de un folio o en forma perpendicular al texto. El texto presenta las tablas, no desarrolla su contenido, éstas deben explicarse en sí mismas. Además de estar

insertadas en el artículo, cada figura y tabla debe ser remitida en su propio archivo como fichero complementario en OJS, con la referencia numérica correspondiente. Los números y símbolos empleados no deben ser menores al tamaño usado en el resto del texto (Arial 11).

Evite las notas al pie en el desarrollo del artículo.

Denominaciones en latín: deben ir en cursiva.

## ESTILO DE CITAS Y REFERENCIAS SEGÚN EL SISTEMA HARVARD

Si el texto está en inglés utilizar «and» en lugar de «y», «In:» en lugar de «En:», «[Accessed: day month year]» en lugar de «[Consulta: día mes año]» y «Available at:» en lugar de «Disponible en:»

### Ejemplos usuales de citas

*Registro de citas textuales*

(López, 1985, p.93)

(González y Rubio, 1990, pp.110-111)

(Johnson, et al., 1970, pp.25-26)

*Para más de una obra del mismo autor y año en citas textuales*

(Alonso, 1988a, p.126-128)

(Alonso, 1988b, p.84)

*Registro de cita ideológica o paráfrasis*

Amor (2000) analiza los motivos para comenzar un negocio en línea...

Si el motivo para comenzar un negocio en línea es sólo para imitar a la competencia, se puede considerar que dicha razón no es la estrategia adecuada (Amor, 2000).

(Pérez y González, 2005)

(Rodríguez, et al., 2011).

(Pérez, 2014a)

(Pérez, 2014b)

### Ejemplos usuales de referencias monografías (libros)

Apellidos(s), Nombre o Inicial, año de edición. *Título del libro en cursiva*. N° de edición. Lugar de edición: editorial. (Serie; N°). ISBN (Este último si se posee) DOI (siempre que el libro lo posea)

Bobbio, Norberto, 1958. *Autobiografía*. Madrid: Taurus. ISBN: 84-306-0267-4.

Newman, R., Walter, C., 2008. *Barley for food and health: science, technology, and products*.

Nueva York: John Wiley & Sons

### Revistas como un todo

*Título de la publicación en cursiva*. Responsabilidad. Edición. Identificación del fascículo. Lugar de edición: editorial, fecha del primer volumen-fecha del último volumen. ISSN

*Boletín Económico*. Banco de España. 1998, (1). Madrid: Banco de España, Servicio de Publicaciones, 1979-. ISSN: 0210-3737

### **Artículos de revistas**

Apellido(s), Nombre o Inicial, año. Título del artículo. En: *Título de la publicación seriada*, Volumen (Número), páginas. DOI (siempre que el artículo lo posea).

Llosa, J., Smith, M., Moore, A. y Cave, K., 1998. Modulo scheduling with reduced register pressure. En: *IEEE Transactions on computers*, 47(6), pp.625-638. DOI: 10.1109/12.689643

Álvarez, Begoña, Ballina, F. Javier de la y Vázquez, Rodolfo, 2000. La reacción del consumidor ante las promociones. En: *MK Marketing + Ventas*, (143), pp.33-37.

### **Normas**

Entidad responsable de la norma (País de la entidad), año de publicación. *No. o código de la norma: Título*. Lugar de publicación: editorial abreviada.

Asociación Española de Normalización y Certificación (España), 2010. *UNE 166000 EX, UNE 166001 EX, UNE 166002 EX: Gestión de la I+D+I*. Madrid: AENOR.

Instituto Uruguayo de Normas Técnicas (Uruguay), 2000. *UNIT-ISO 9001: Sistemas de gestión de calidad - requisitos*. Montevideo: UNIT.

### **Textos electrónicos, bases de datos y programas informáticos**

Responsabilidad principal, año. *Título* [tipo de soporte]. Edición. Lugar de publicación: editor, [fecha de consulta]. Descripción física. (Colección). Notas. Disponibilidad y acceso. Número normalizado. DOI (siempre que el material lo posea)

Rapp, A. O., Augusta, U. y Peek, R. D., 2001. *Facts and ideas of testing wood durability above ground* [En línea]. Hamburgo: BFH. [Consulta: 25 de setiembre de 2008]. Disponible en: <http://www.bfafh.de/inst4/43/pdf/3doublay.pdf>

### **Patentes**

Mención de responsabilidad principal, Año de publicación del documento. *Denominación del elemento patentado*. Identificador del documento (país u oficina que lo registra). Clase internacional de documento de patente. Número.

Green, Daniel R., 2008. *Cereal flake with topical pieces*. United State Patent. 0101. D572,427.

Crosa, M. J., Harispe, R., Repiso, L., Silvera, C. y Wurtz, P, 2009. *Sistema que acelera el ingreso de solutos en alimentos porosos*. Uruguay. Dirección Nacional de la Propiedad Industrial. 31620.



## Monitoreo de calidad de agua y predicción de coliformes fecales en playas de Montevideo mediante algoritmos de aprendizaje automático

Water quality prediction using machine learning algorithms in recreational beaches from Montevideo, Uruguay

Previsão da qualidade da água usando modelos de aprendizado de máquina em praias recreativas de Montevideú, Uruguai

Ángel Segura<sup>1</sup>, \* <https://orcid.org/0000-0002-1989-8899>

Lía Sampognaro<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-7718-9820>

Guzmán López<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-1343-492X>

Carolina Crisci<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-3089-8048>

Mathías Bourel<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-7472-7179>

Victoria Vidal<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-8623-7804>

Karina Eirin<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-6588-4738>

Claudia Piccini<sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2762-1953>

Carla Kruk<sup>4</sup> <https://orcid.org/0000-0003-0760-1186>

Gonzalo Perera<sup>1,2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-7530-3503>

\*Autor de contacto: [amsegura@fcien.edu.uy](mailto:amsegura@fcien.edu.uy)

<sup>1</sup>Modelización Estadística de Datos e Inteligencia Artificial (MEDIA), Centro Universitario Regional Este (CURE), Universidad de la República. Rocha, Uruguay.

<sup>2</sup>Instituto de Matemática y Estadística Prof. Rafael Laguardia, Facultad de Ingeniería, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

<sup>3</sup>Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Ministerio de Educación y Cultura. Montevideo, Uruguay.

<sup>4</sup>Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales (IECA), Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

**Recepción:** 4 Agosto 2020 **Aprobación:** 16 Junio 2021

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución NoComercial 4.0 Internacional.

**Resumen:** En este trabajo se construyeron modelos de predicción de coliformes fecales (CF) para su aplicación en la gestión de calidad de agua de playas recreativas de Montevideo. Se analizó la base de datos histórica del monitoreo de CF en playas realizado por el Laboratorio de Calidad Ambiental de la Intendencia de Montevideo (IM), y se generaron modelos basados en Aprendizaje Automático (AA) para predecir excesos (CF > 2.000). Los datos abarcan 10 años de monitoreo en 21 playas de la capital (N=19359, noviembre 2009 a septiembre 2019), y presentan un amplio rango de salinidad y turbidez, con marcadas diferencias entre playas. Los CF presentaron una distribución asimétrica (mínima=4, mediana=250, media=1.047 y máxima=1.280.000) con excesos a la normativa en todas las playas. Las variables registradas *in situ*, meteorológicas y oceanográficas, fueron utilizadas para entrenar modelos de AA. El mejor modelo fue un bosque aleatorio estratificado con un porcentaje de acierto para los excesos del 86%. La predicción de excesos mejoró un 60% respecto al criterio actual de cierre de playas las 24 horas posteriores a precipitaciones. La generación de datos de calidad por parte de la Intendencia de Montevideo, junto con estrategias de modelización inteligente, resultan un insumo relevante para la gestión de playas recreativas.

**Palabras clave:** bosques aleatorios, datos desbalanceados, contaminación, playas recreativas, salud humana.

**Abstract:** We constructed Machine Learning (ML) models to predict faecal coliforms (FC) for water quality aid management in recreational beaches. Historical data base generated by the Laboratorio de Calidad Ambiental de la Intendencia de Montevideo (IM) was analyzed and ML models were constructed to predict FC excess (FC > 2.000). Ten years of monitoring 21 recreational beaches (N=19359, November 2009 to September 2019) presented a wide range of salinity and turbidity variability among beaches. FC showed an asymmetric distribution (min=4, median=250, average=1.047 and max=1.280.000) with values exceeding the threshold in all beaches. *In situ* registered, meteorological and oceanographic variables were used to train ML models. A stratified Random forests showed the best performance in the evaluated metrics with an overall accuracy of 86% and 60% of improvement in true positive rates with respect to baseline. High quality data generated by governmental institution together with modelling strategies provided a relevant framework to aid in beach and public health management.

**Keywords:** random forests, unbalanced data, contamination, recreational beach, human health.

**Resumo:** Construimos modelos de aprendizaje de máquina (AM) para prever a qualidade da água a fim de auxiliar o gerenciamento em praias recreativas e a balneabilidade. A base de dados históricos gerada pelo Laboratório de Calidad Ambiental de la Intendencia de Montevideo foi analisada e modelos de AM foram construídos para prever o excesso de coliformes fecais (CF > 2.000). Dez anos de monitoramento de 21 praias de lazer (N=19359, novembro de 2009 a setembro de 2019) apresentaram uma ampla gama de variabilidade de salinidade e turbidez entre as praias. O CF mostrou uma distribuição assimétrica (min=4, mediana=250, média=1,047

e máx=1.280.000) com valores acima do limiar em todas as praias. Registradas *in situ*, variáveis meteorológicas e oceanográficas foram usadas para treinar modelos de AM. Uma floresta aleatória estratificada mostrou o melhor desempenho nas métricas avaliadas, com uma precisão geral de 86% e 60% de melhoria nas taxas positivas verdadeiras em relação à linha de base. Dados de alta qualidade gerados por instituições governamentais, juntamente com estratégias de modelagem, forneceram uma estrutura relevante para auxiliar na gestão de praias e da saúde pública.

**Palavras-chave:** floresta aleatória, dados não balanceados, contaminação, praia recreativa, saúde humana.

## INTRODUCCIÓN

El turismo es una de las actividades con mayor crecimiento en las últimas décadas. En Uruguay, el turismo de sol y playa es un componente importante tanto a nivel social como económico (Gorfinkiel, 2006). Este uso requiere el control de la calidad de las playas para la prevención de riesgos en la salud de los bañistas. La contaminación por aguas cloacales, indicada por concentraciones elevadas de bacterias (coliformes fecales - CF), es un riesgo importante para la salud ambiental y humana (Sabino, et al., 2014). Este es un problema actual en Uruguay (Kruk, et al., 2018) y en la región (Conde, et al., 2002), sobre el cual es necesario desarrollar medidas de gestión eficientes. Una de las grandes limitaciones para anticipar eventos de contaminación es que la estimación de la concentración de CF mediante métodos estándar requiere de 18 a 24 horas de incubación, lo que impide una predicción en tiempo real de la calidad de un ecosistema. La generación de modelos estadísticos que vinculen características del medio de fácil registro con el nivel de contaminación permite anticiparse a estos eventos y, por lo tanto, cuidar la salud de los bañistas (Bedri, et al., 2016).

La contaminación de las playas por aguas de origen cloacal es particularmente frecuente en las zonas costeras (Lotze, et al., 2006; Mara, 2013), especialmente en aquellas sin saneamiento adecuado, donde está directamente asociada al número de habitantes (Kruk, et al., 2019). La contaminación puede llegar a la costa no solo a través de la descarga de efluentes sino también desde el subsuelo contaminado (Giampaoli y Spica, 2014). La recreación en aguas contaminadas incrementa la probabilidad de contraer enfermedades que incluyen una amplia variedad de infecciones gastrointestinales, respiratorias, neurológicas, de la piel, de los oídos, de los ojos y de las heridas (Sabino, et al., 2014). Los niños, las mujeres embarazadas, los ancianos y las personas con el sistema inmunitario debilitado o comprometido son más susceptibles a contraer estas enfermedades (Wade, et al., 2008; Heaney, et al., 2009). Dado que los microorganismos patógenos suelen estar en baja concentración, y su detección y cuantificación resulta laboriosa (Savichtcheva y Okabe, 2006), se monitorea la

calidad bacteriológica a través de la abundancia de microorganismos cultivables indicadores de contaminación fecal (por ejemplo, coliformes, enterococos), cuya concentración se asocia con la probabilidad de desarrollo de una enfermedad específica (Sabino, et al., 2014; WHO, 2018). Los protocolos de monitoreo y valores límites permitidos e incluidos en las normativas varían entre países, e incluso dentro de un mismo país, según el cuerpo de agua monitoreado. En Uruguay, los resultados de coliformes fecales se comparan con el criterio establecido en el Decreto 253/79 (Uruguay, 1979), modificativos posteriores, y la resolución del Ministerio de Vivienda Orden Territorial y Medio Ambiente del 25 de febrero de 2005 (Uruguay, 2005), clasificando a las playas en la Clase 3. De acuerdo con esta clasificación, no se deberá exceder el límite de 2.000 UFC/100 mL en ninguna de al menos 5 muestras, debiendo estar por debajo de 1.000 UFC/100 mL la media geométrica móvil.

La red de saneamiento de Montevideo en la zona Este está conectada al sistema de alcantarillado pluvial que, luego de un tratamiento de las aguas, descarga a 2 km de la costa, a la altura de Punta Brava, en Punta Carretas (Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, 2020). Además, en ciertos puntos de la costa hay estructuras destinadas a disminuir el flujo de la red cuando las precipitaciones son intensas, las cuales durante dichos eventos descargan directamente sobre la costa (Figura 1; Intendencia de Montevideo, 2019). En la zona Oeste, se está proyectando una red de saneamiento: actualmente, las descargas de efluentes domésticos se dan a través de la napa o de los cursos de agua locales, que están a su vez influidos por las descargas pluviales.

La Intendencia de Montevideo (IM) es la institución encargada de velar por la calidad de agua de las playas capitalinas. Cuenta con un sistema de monitoreo histórico que comprende 23 playas y varios puntos a lo largo de toda la costa de Montevideo. Las playas son muestreadas con una frecuencia de hasta 4 veces por semana en temporada estival. La sugerencia de cerrar playas por excesos se realiza en base a los indicadores de CF de los días previos, o en forma genérica luego de la ocurrencia de precipitaciones en las 24 o 36 horas previas (Intendencia de Montevideo, 2019). Estas decisiones se basan en información empírica o en la literatura proveniente de otros países, y no existe un modelo estadístico específico que permita aportar predicciones concretas.

Globalmente, se utilizan diversos tipos de algoritmos o criterios para predecir la contaminación mediada por CF en playas. Evitar el baño luego de copiosas lluvias es el criterio más ampliamente utilizado (Bouchalová, et al., 2013; Eregno, et al., 2016; Zhang, et al., 2015), aunque se registran variaciones según el país y entre playas de una misma zona. Por tanto, mejorar la capacidad de predicción con respecto a la clausura por lluvias es relevante para proteger la salud de los

bañistas, así como evitar el cierre innecesario de playas. Los modelos más utilizados son las regresiones lineales múltiples (Thoe y Lee, 2014; Shively, et al., 2016; Searcy, et al., 2018), que asumen un modelo determinado de relación lineal entre los CF y un grupo de variables ambientales de fácil registro. También se han incorporado otras técnicas de modelización como redes neuronales (He y He, 2008; Zhang, et al., 2015), modelos lineales mixtos (Jones, et al., 2013), modelos de combinación de árboles, regresiones lineales parciales y logísticas (Brooks, et al., 2013; 2016). La agencia de protección ambiental de Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) provee un programa disponible en línea para estimar los CF mediante regresión múltiple, regresión parcial y combinación de árboles mediante modelos boosting (United States Environmental Protection Agency, 2019). El desafío de predecir estos fenómenos radica en su fuerte comportamiento no lineal que requiere emplear técnicas y métodos con la flexibilidad suficiente (Bourel y Segura, 2018). El desarrollo de algoritmos flexibles y capaces de aprender de los datos ha evolucionado en las últimas décadas junto con el poder de cómputo, componiendo una serie de técnicas denominadas de "Aprendizaje automático" (Machine Learning) que han demostrado una mejor performance en este tipo de problemas (Avila, et al., 2018; Park, et al., 2018; Shively, et al., 2016). Una de las características más sobresalientes de estas aproximaciones es que, en general, se basan en algoritmos y no en un modelo estocástico predeterminado, pueden lidiar con interacciones de alto orden, y están desarrolladas para "aprender" de los datos que se disponen y generar mejores predicciones ante la generación de nuevos datos (Bourel y Segura, 2018; Crisci, et al., 2012). Las redes neurales, los bosques aleatorios (random forest; Breiman, 2001) y las máquinas de vectores soporte (Vapnik, 1998) han sido ampliamente utilizados en problemas de predicción de calidad de agua (He y He, 2008; Park, et al., 2018; Parkhurst, et al., 2005; Zhang, et al., 2015). Estos métodos han sido aplicados con éxito para predecir floraciones de cianobacterias tóxicas en Uruguay (Crisci, et al., 2017; Kruk, et al., 2017, 2015; Martínez de la Escalera, et al., 2017; Segura, et al., 2017) y floraciones marinas (Bourel, et al., 2017), pero no en predicción de coliformes fecales en playas recreativas. Además, el fuerte desbalance (90/10) en la relación entre casos negativos (que no exceden el límite de contaminación establecido en la normativa) y positivos (que exceden la normativa) requiere el uso de nuevas técnicas con las que entrenar los algoritmos.

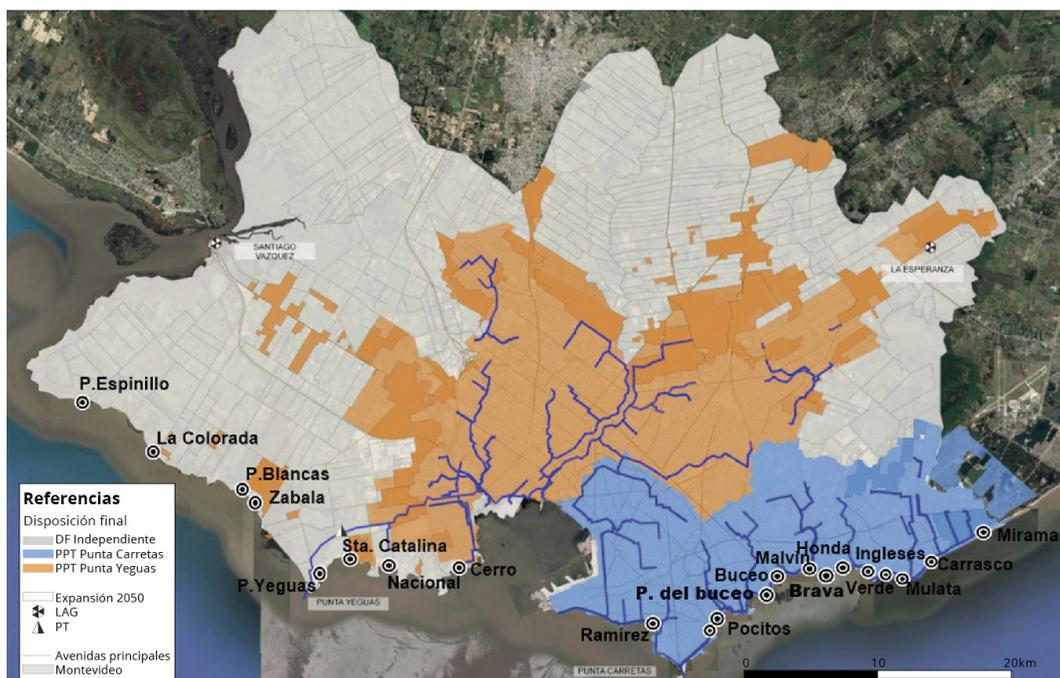
En el presente trabajo se analizó la serie histórica de monitoreo de playas de Montevideo y se aplicó una variedad de modelos predictivos basados en técnicas de aprendizaje automático para: i) describir las principales tendencias y patrones espacio-temporales en la ocurrencia e incidencia de CF en las distintas playas de Montevideo y ii) desarrollar y evaluar la capacidad predictiva de los modelos de predicción de estos eventos. En base a estos resultados, se pretende aportar al desarrollo de un sistema que transforme la información

generada en un producto fácilmente aplicable a la gestión del baño en playas. Se realiza además una introducción básica a los modelos utilizados y al modo de evaluación de la calidad de éstos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Plan de monitoreo de calidad de agua de la IM**

La serie de datos analizada proviene del programa de monitoreo de agua de playas y costas del departamento de Montevideo, realizado por la Intendencia de Montevideo (Departamento de Desarrollo Ambiental, Servicio de Evaluación de Calidad y Control Ambiental), con el objetivo de controlar la calidad del agua de las playas y prevenir riesgos en la salud de los bañistas (para acceder a la base de datos, se debe solicitar al Servicio de Evaluación de Calidad y Control Ambiental de la IM). Los datos de las posiciones de los muestreos se encuentran en el Informe anual de evaluación de calidad del agua de playas y costas de Montevideo para el período abril 2016 - marzo 2017. Durante el monitoreo, las principales variables medidas *in situ* fueron: temperatura del agua, salinidad, turbidez, conductividad, oxígeno disuelto (O<sub>2</sub>), y presencia de espuma cianobacteriana. Además, se tomaron muestras para su procesamiento en laboratorio, donde se estimó la concentración de clorofila *a*, feopigmentos, microcistinas totales, nitrógeno total, fósforo total, presencia de espuma y concentración de coliformes termotolerantes fecales. La concentración de coliformes fue estimada siguiendo los procedimientos estandarizados de operación del Laboratorio Ambiental de DINAMA (Uruguay. Ministerio de Ambiente, Dirección Nacional de Medio Ambiente, 2017), que se basa en la técnica de filtración por membrana de APHA (American Public Health Association, American Water Works Association y Water Environment Federation, 2012) en el Departamento de Desarrollo Ambiental, Servicio de Evaluación de Calidad y Control Ambiental de la Intendencia de Montevideo.



**Figura 1.** Mapa del departamento de Montevideo donde se muestran los tipos de saneamiento por zonas: Descarga final independiente (gris), Planta de pretratamiento Punta Carretas, tipo unitario (azul), y planta de pretratamiento Punta Yeguas, tipo separativo (naranja). Además, se indica la ubicación de los puntos de muestreo de playas (puntos negros). Modificado de Plan Nacional de Saneamiento (Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, 2020).

### Exploración de datos *in situ*

Se compilaron e integraron las matrices biológicas y ambientales derivadas de los monitoreos de calidad de agua de la IM y las posiciones espaciales de los sitios de muestreo, y se realizaron controles de calidad para depurar inconsistencias (por ejemplo, datos de temperatura menores a 0 y mayores a 40 °C y de salinidad menores a 0 y mayores a 35). La distribución histórica (Número de datos=19359; desde 2009 a 2019) de las principales variables como temperatura, salinidad, turbidez y CF (logaritmo en base 10), en cada una de las 21 playas monitoreadas de Oeste a Este, fue resumida temporal y espacialmente mediante gráficos descriptivos. La correlación de las variables ambientales entre playas fue evaluada mediante el coeficiente de correlación de Spearman (S).

### Bases de datos meteorológicas

Se extrajeron series temporales de valores de variables meteorológicas relevantes de bases de datos digitales del INIA (Instituto Nacional de

Investigación Agropecuaria, s.d.) y de Meteomanz.com (Meteomanz.com, s.d.). Las variables relevadas fueron: precipitación, temperatura del aire, humedad relativa, nubosidad e intensidad y dirección del viento. A partir de la variable precipitación (Pp) se calculó la precipitación acumulada en 1, 2, 3 y hasta 7 días.

## Modelización

En este trabajo aplicaremos técnicas de aprendizaje automático supervisadas (Hastie, et al., 2009). Más precisamente se quiere buscar modelar o predecir una variable de salida o de respuesta  $Y$  en función de variables de entrada o explicativas  $X$ . En este caso, la variable de respuesta  $Y$  es una variable binaria que toma dos valores: 0 o 1. Si la playa excede (E), en este caso  $Y$  vale 1, o no excede (NE), en este caso  $Y$  vale 0, el umbral máximo definido en la normativa. Si el registro en una playa es mayor a 2000 UFC/100 mL, definimos el estado de la playa como E; mientras que si se registra una concentración menor a 2000 UFC/100 mL, definimos el estado de la playa como NE. De esta forma, tenemos un problema que se conoce como de clasificación. En este contexto, entrenaremos un modelo que nos permitirá predecir si una playa excede (E) o no excede la normativa (NE) sin necesidad de obtener el valor de CF en el laboratorio. En el caso de clasificación desbalanceada, es decir, cuando la relación entre casos de cada clase no mantiene una proporción equitativa, es necesario además introducir técnicas de preparación de los datos que disminuyan el desbalance y mejoren la eficiencia de los algoritmos sobre la clase minoritaria, que es en general la que presenta mayor dificultad en predecir adecuadamente. En nuestro contexto, esta clase minoritaria es E y tiene gran relevancia en términos sanitarios. El tratamiento extensivo de estas técnicas está fuera del objetivo de este trabajo, pero quien tenga interés se puede referir a los trabajos de Chawla y otros (2002) y Kuhn y Johnson (2016).

## Algoritmos

Para clasificar el estado de las playas se emplearon 9 algoritmos en combinación con un tratamiento específico de los datos para manejar el desbalance. Los algoritmos utilizados fueron: análisis lineal discriminante (LDA), máquinas de vectores soporte (SVM), modelos lineales generalizados (GLM), árboles de clasificación y regresión (CART), y dos métodos de combinación de árboles: Adaboost y bosques aleatorios. Sobre este último consideramos tres variantes: con punto de corte variable (RFcf), RF con muestreo estratificado (RFst) y los RF con pesos diferenciales para las clases (Rfcw). Una introducción conceptual y formal a estos modelos se puede encontrar en Bourel y Segura, 2018. Las variantes de RF han sido desarrolladas por su creador (Breiman, 2001), y programadas y utilizadas en numerosas aplicaciones en ecología y calidad de agua (Cutler, et al., 2007; Kruk, et al., 2015; Segura, et al., 2017). Todos los

modelos y análisis fueron ejecutados en el software estadístico de libre acceso R (R Core Team, 2020).

Además, se consideró también el modelo propuesto por la EPA-EEUU para calidad bacteriológica del agua "Virtual Beach", que está disponible en línea de forma gratuita. Este programa implementa una regresión lineal múltiple y un algoritmo de combinación de árboles (Xgboost) (Cyterski, et al., 2014; Zepp, et al., 2010).

En todos los casos, el conjunto de datos L ingresados al modelo tuvieron cuatro posibles pretratamientos, i) el mismo conjunto L de datos originales, ii) un conjunto donde a L se le agrega réplicas de los datos de la clase minoritaria para balancear artificialmente el conjunto (Upsampling) (Kuhn y Johnson, 2016), iii) un conjunto obtenido a partir de L en el que la clase mayoritaria fue reducida mediante selección aleatoria de casos al número de la clase minoritaria (Downsampling) (Kuhn y Johnson, 2016), y iv) un conjunto donde se le agrega a L, de manera sintética, observaciones de la clase minoritaria (Chawla, et al., 2002).

### **Estrategia de modelización**

Para construir y evaluar los modelos, se utilizó una estrategia de partición de los datos en la cual: i) se entrenaron los algoritmos empleando los datos hasta el mes de septiembre de 2017 (no inclusive) y ii) se evaluó la capacidad predictiva con los datos comprendidos entre septiembre de 2017 y septiembre de 2019. Esta partición permite evaluar predicciones reales e incluye un gran número de casos para el entrenamiento y la evaluación, por lo que no conlleva a sesgos creados por la misma. De esta forma se evalúa sobre datos "frescos" (que no fueron utilizados para entrenar los métodos) la adecuación de los modelos (Crisci, et al., 2012; Hastie, et al., 2009).

### **Evaluación de modelos**

Para definir una playa con riesgo de contaminación fecal se tomó como línea de base el registro de precipitaciones en las 24 horas previas. Definimos que la playa presenta un exceso (E) si en las 24 previas se registraron precipitaciones positivas. Utilizaremos este ejemplo para definir la matriz de confusión, e introducir algunas métricas que serán útiles para evaluar el desempeño predictivo del modelo. La matriz de confusión es una tabla, en cuyas celdas se registran los aciertos y los errores de utilizar un determinado criterio de clasificación respecto a lo observado (Tabla 1). De la intersección de los valores observados y predichos se desprende que puede haber dos tipos de aciertos, predecir E cuando la observación es E, los verdaderos positivos (VP), y predecir

NE cuando la observación es NE, los verdaderos negativos (VN). Estos aciertos se encuentran repertoriados en la diagonal. En un clasificador ideal, todos los casos deberían estar en la diagonal. Entre los dos tipos de errores es fácil identificar que no tienen la misma importancia, pues predecir que no hay exceso cuando sí lo hubo (falso negativo, FN) implica que los bañistas estuvieron expuestos a condiciones con potenciales efectos sobre su salud. Mientras que predecir un exceso cuando no lo hubo (falso positivo, FP) implica que se cierra la playa sin un motivo aparente.

**Tabla 1.** Matriz de confusión teórica. En las columnas se agregan los valores observados en la realidad y en las filas los valores predichos.

|                         |                | Observado                                      |   |
|-------------------------|----------------|--|---|
|                         |                | Excede (E)                                     | No Excede (NE)                                      |
| Predicción de un modelo | Excede (E)     | Verdadero Positivo (VP)                        | Falso positivo (FP)<br>(Cierra la playa sin motivo) |
|                         | No Excede (NE) | Falso Negativo (FN)<br>(Peligro para la salud) | Verdadero Negativo (VN)                             |

Una métrica inmediata que se puede calcular a partir de esta tabla es el porcentaje total de aciertos (Acc):

$$\text{Acc \%} = 100 \frac{\text{VP} + \text{VN}}{\text{VP} + \text{FP} + \text{FN} + \text{VN}} \quad (1)$$

Sin embargo, cuando las clases están desbalanceadas, como en el caso de los excesos de CF, es necesario considerar otras métricas. En efecto, si tenemos una muy baja proporción de datos de la clase minoritaria E, por ejemplo 5%, tener un modelo que acierta en un 95% podría ser un modelo que no acierta en ninguna de las observaciones de la clase minoritaria, a pesar de que su desempeño global es muy bueno pero que expone a los bañistas en ese 5% restante de los casos a riesgos para la salud. Una métrica que pondera los aciertos de la clase minoritaria es la Tasa de Verdaderos Positivos (TVP), que divide los aciertos en la clase E sobre el total de Excesos observados:

$$\text{TVP \%} = 100 \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}} \quad (2)$$

TVP es una métrica importante de maximizar, junto con la Tasa de Verdaderos Negativos (TVN):

$$\text{TVN \%} = 100 \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FP}} \quad (3)$$

El mejor modelo será aquel que maximice ambas métricas, pero -como se verá- en general existe un compromiso entre ambas, y en cierto punto, cuando una aumenta, la otra tiende a disminuir.

A los efectos de ilustrar las métricas consideradas anteriormente analizaremos en la Tabla 2 un caso hipotético.

**Tabla 2.** Ejemplo hipotético de días, estado de las playas observado (Excede -E- y No Excede -NE-) y predicción de la línea de base (lluvias en las 24hs previas, Pp24) y de un modelo predictivo hipotético que llamaremos AA.

| Día                      | 1        | 2         | 3         | 4         | 5         | 6         | 7         | 8        | 9         | 10        |
|--------------------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|
| <b>Observado</b>         | <b>E</b> | <b>NE</b> | <b>NE</b> | <b>NE</b> | <b>NE</b> | <b>NE</b> | <b>NE</b> | <b>E</b> | <b>NE</b> | <b>NE</b> |
| Predicción Pp24          | E        | E         | NE        | NE        | NE        | NE        | E         | NE       | NE        | NE        |
| Predicción del modelo AA | E        | NE        | NE        | NE        | NE        | NE        | NE        | E        | E         | NE        |

La matriz de confusión resultante de aplicar el criterio de Pp24 es la que aparece en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Matriz de confusión basada en la línea de base (Pp24) de la tabla 2.

|            |                | Observado  |                |
|------------|----------------|------------|----------------|
|            |                | Excede (E) | No Excede (NE) |
| Predicción | Excede (E)     | 1          | 2              |
|            | No Excede (NE) | 1          | 6              |

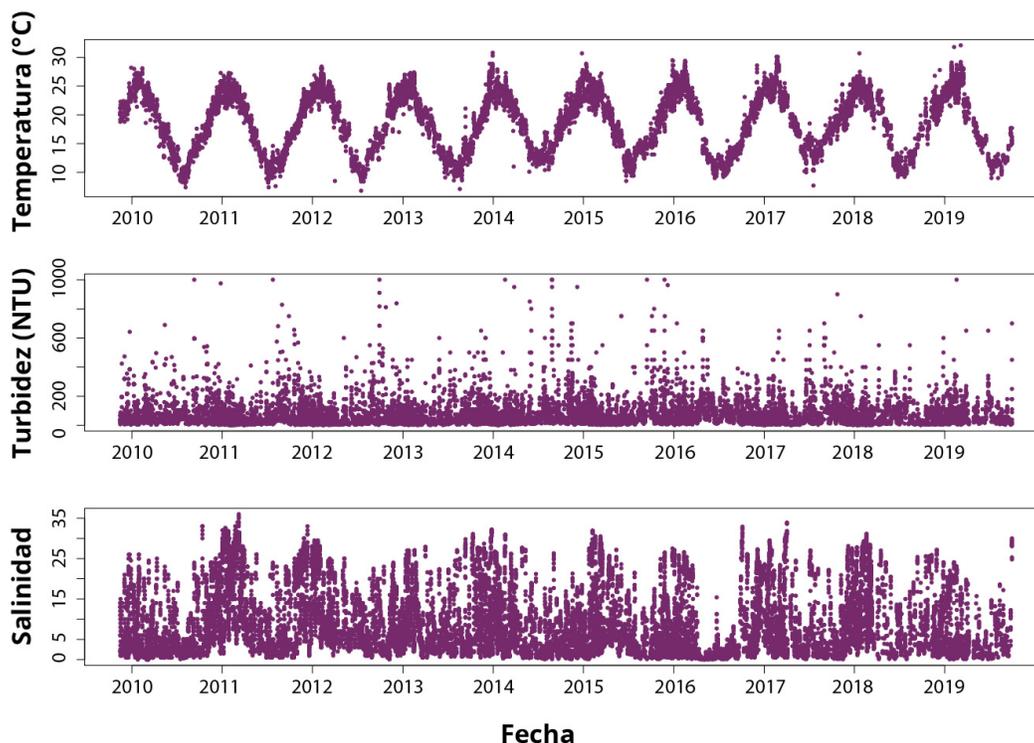
En este caso, observamos que el clasificador acertó a un exceso y en 6 ocasiones que no hubo exceso, pero se cerró la playa en 2 ocasiones donde no era necesario, mientras que en una ocasión no se predijo un exceso cuando lo hubo. El modelo de AA en el caso del ejemplo superó en todas las métricas a la línea de base (Pp24), y por lo tanto es más adecuado para modelar este problema (Tabla 4). Los modelos fueron generados para todo el conjunto de playas y evaluados de forma global y calculando las métricas (Acc, TVP, TVN) para cada playa.

**Tabla 4.** Resumen de las métricas de evaluación de la calidad de predicción al aplicar la línea de base (Pp24) y el modelo de inteligencia artificial (AA) para predecir el ejemplo hipotético del estado de la playa.

| Modelo           | Acc | TVP | TVN   |
|------------------|-----|-----|-------|
| <b>Pp24</b>      | 0.7 | 0.5 | 0.75  |
| <b>Modelo AA</b> | 0.9 | 1   | 0.875 |

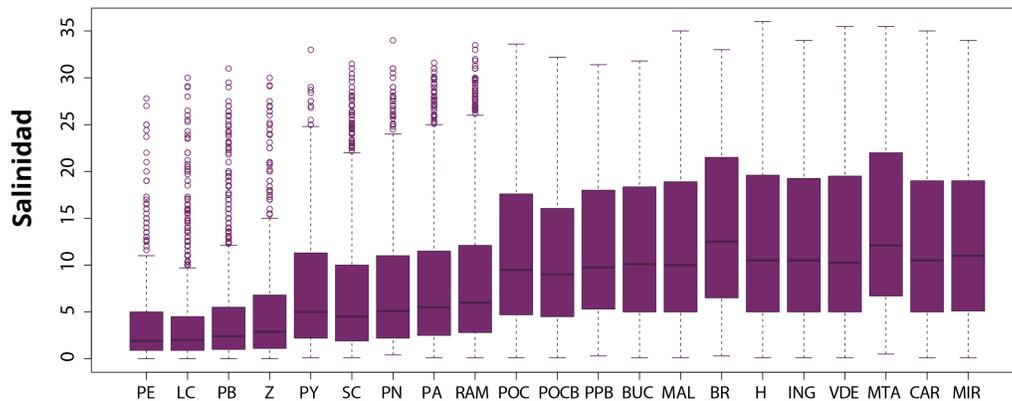
## RESULTADOS

Las variables ambientales periódicamente monitoreadas *in situ* en las 21 playas analizadas desde noviembre de 2009 hasta septiembre de 2019 tuvieron comportamientos estacionales. La temperatura mostró oscilaciones entre 7.1 y 32.2 °C, y un comportamiento estacional similar para todas las playas (Figura 2). La turbidez (rango 0-1000) y la salinidad (rango 0-35) presentaron fluctuaciones estacionales menos periódicas que la temperatura, con una mayor variabilidad entre playas (Figura 2). Fue notoria la diferencia en la salinidad entre las playas del Este y del Oeste (Figura 3).



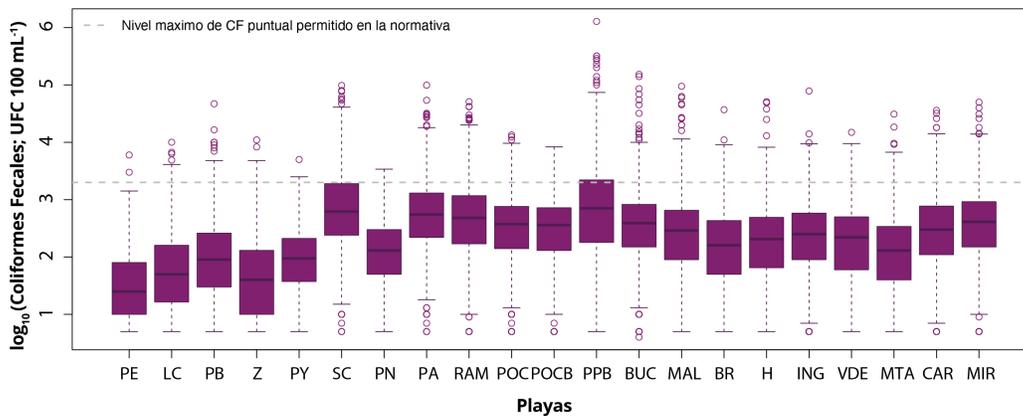
**Figura 2.** Dinámica temporal de las variables ambientales más relevantes registradas *in situ* en el plan de monitoreo de la IM.

Se cuantificó la abundancia de coliformes fecales (CF; UFC/100 mL) en 19359 casos (Tabla S1). Todas las playas presentaron casos con excesos puntuales (CF > 2000 UFC/100 mL) en el transcurso del monitoreo.



**Figura 3.** Salinidad por playa ordenadas de Oeste a Este. Nótese el incremento de salinidad de valores menores a 5 en el Oeste a valores de 10 en la zona Este (luego de RAM). La línea negra horizontal en cada caja indica la mediana de la distribución, y las cajas los cuantiles 0.25 (borde inferior) y 0.75 (borde superior) de la distribución.

Los CF tuvieron una distribución asimétrica (mínima=4, mediana=250, media=1.047 y máxima=1.280.000; Figura 4) y la proporción de excesos puntuales (CF > 2.000) global fue cercana a 8% con diferencias entre playas (Figura 4). El número de excesos fue variable entre playas (entre 2 y 275), al igual que la proporción de excesos sobre las muestras realizadas, que se ubicó entre 0.45 y 29% (Tabla S1). Las playas con mayores proporciones de excesos fueron Puerto del Buceo (PPB=29%), Santa Catalina (SC=24%), Playa del Cerro (PA=19%), Ramírez (RAM=16%) y Miramar (MIR=13%). Las playas con menor número de excesos se encontraron en general al Oeste, y fueron Punta Espinillo (PE=0.45%), Playa Nacional (PN=0.9%), Punta Yeguas (PY=1.2%) y La Colorada (LC=1.6%).



**Figura 4.** Distribución de los coliformes fecales (logaritmo en base 10) en cada playa en toda la serie de datos de 2009 a 2019. La línea punteada gris representa el valor máximo permitido por la normativa para excesos puntuales en playas recreativas (CF < 2000 UFC/100 mL). La línea negra horizontal en cada caja indica la mediana de la distribución, y las cajas los cuantiles 0.25 (borde inferior) y 0.75 (borde superior) de la distribución. Las playas se encuentran ordenadas de Oeste a Este.

### Modelación de la dinámica de coliformes fecales

La línea de base, tomando en cuenta la precipitación en las 24 horas previas como criterio para considerar un exceso, presentó un porcentaje total de aciertos del 82%, una tasa de verdaderos positivos (TVP) del 40% y una tasa de verdaderos negativos (TVN) de 85%.

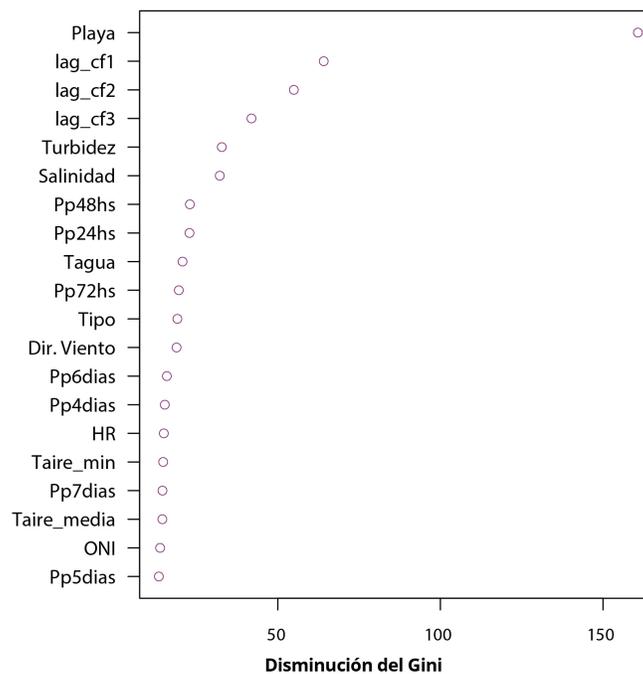
Los modelos que superaron la performance de la línea de base en todas las métricas fueron el bosque aleatorio estratificado (RFst), la máquina de vectores soporte (SVM) con datos balanceados por SMOTE y upsampling (Tabla 5). La combinación de árboles con Adaboost en los datos balanceados con SMOTE no superó la línea de base en el total de aciertos o en la tasa de verdaderos negativos, pero estuvo muy cercana y con la mejor performance en los verdaderos positivos (Tabla 5). El modelo de bosque aleatorio estratificado mostró un desempeño superior, mejorando a sus competidores directos en todas las métricas y a la línea de base (Tabla 5).

**Tabla 5.** Métricas para evaluación de los mejores modelos seleccionados para la predicción de excesos puntuales. Los mejores modelos fueron los bosques aleatorios estratificados (RFst) utilizando los datos originales (Originales), las máquinas de vectores soporte (SVM) y Adaboost ambos entrenados sobre una base de datos modificada (Upsampling o SMOTE). Se presenta el porcentaje total de aciertos (Acc%), la tasa de verdaderos positivos (TVP%) y la tasa de verdaderos negativos (TVN%). El tratamiento de los datos y el tipo de modelo

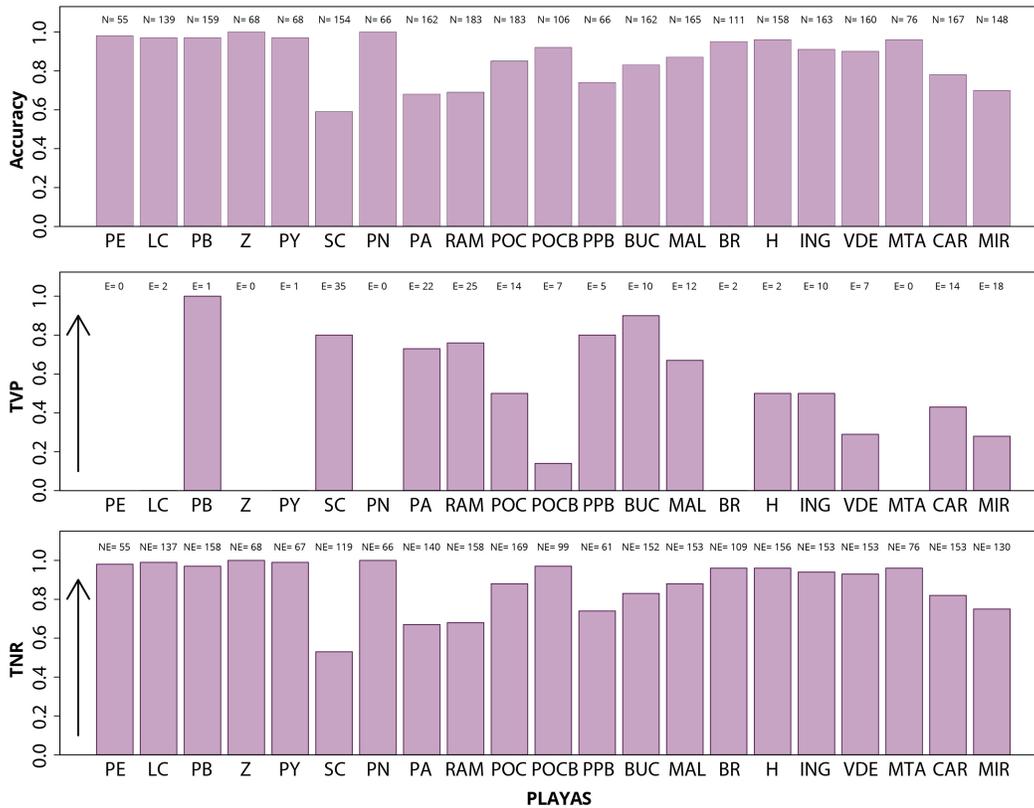
utilizado se compara con la línea de base (Pp24). Se presenta además el caso en el cual ningún dato excede el umbral máximo definido en la normativa (Nunca Excede) y el modelo propuesto por la agencia de protección ambiental de Estados Unidos (EPA).

| Datos             | Modelo       | Acc%      | TVP%      | TVN%      |
|-------------------|--------------|-----------|-----------|-----------|
| Originales        | RFst         | 84        | 63        | 85        |
| Upsampling        | SVM          | 84        | 58        | 86        |
| SMOTE             | SVM          | 84        | 48        | 86        |
| SMOTE             | Adaboost     | 83        | 64        | 84        |
| <b>Originales</b> | <b>Pp24</b>  | <b>82</b> | <b>40</b> | <b>85</b> |
| Originales        | Nunca Excede | 93        | 0         | 0         |
| Originales        | EPA-RMCP     | 89        | 3         | 1         |

Las variables más importantes obtenidas a partir de RFst, según el criterio de importancia de variables definido para RF, fueron la playa, la concentración de los coliformes en esa playa en el muestreo previo (lag\_cf), la salinidad y la turbidez registradas *in situ* y las precipitaciones acumuladas en 24 horas (Figura 5). En las playas con mayor número de excesos (PA, SC, RAM), el modelo presentó una capacidad de predicción de los casos riesgosos para la salud (TVP) de 86, 82 y 76% respectivamente (Figura 6).



**Figura 5.** Importancia de las principales variables medida como la disminución en el índice de Gini, ordenadas de forma decreciente para el modelo de bosques aleatorios estratificados (RFst). Por ejemplo, los lag de coliformes fecales (lag\_cf) son más relevantes que el Índice Oceánico del Niño (ONI). No se muestran las variables con importancia relativa menor.



**Figura 6.** Métricas por playa ordenadas de Oeste a Este para el RFst, que fue considerado el mejor modelo. Se muestra además el número de casos totales (N), el número de excesos por playa (E) y el número de veces que la playa presentó valores dentro de la reglamentación (NE).

## DISCUSIÓN

En este trabajo se emplearon técnicas de aprendizaje automático para modelar una extensa serie de datos espacio-temporales con dinámicas complejas. Dichos modelos mejoraron la predicción de eventos donde se excedió la normativa de contaminación fecal en playas recreativas con respecto a la línea de base establecida en función de las precipitaciones en las 24 hs previas. Se describieron además los patrones espacio-temporales de variabilidad ambiental en las playas y el gradiente entre las zonas Oeste y Este de Montevideo. Este tipo de modelización aporta herramientas para minimizar el impacto de la contaminación en la salud humana, advirtiendo a las

autoridades con antelación la probabilidad de exceso de coliformes fecales en el agua. Los modelos utilizados son flexibles, proveen resultados en tiempo real, y tienen la capacidad de “aprender” asimilando nueva información, por lo cual pueden ser incorporados en un esquema de gestión y monitoreo de ciudades inteligentes (Searcy, et al., 2018). Sin embargo, es crucial mejorar el tratamiento de las aguas que se vierten en el estuario del Río de la Plata, pues se registraron valores de concentración de coliformes fecales que exceden la normativa en todas las playas, y en algunos casos con valores órdenes de magnitud por encima de la normativa.

Este trabajo presenta un resumen de la información colectada en más de 10 años de muestreo en las playas de Montevideo. Se evidencian las diferencias en la dinámica entre las Playas al Oeste y al Este de Montevideo, tomando como sitio de corte Punta Brava. Los cambios estacionales en las variables hidrográficas reflejan la dinámica de la zona media del estuario (Calliari, et al., 2005; Simionato, et al., 2010), marcando la transición que genera el desplazamiento estacional del frente de turbidez y de salinidad. Es importante destacar que las mediciones son realizadas en una zona somera (prof = 1m), por lo tanto, existen efectos locales que pueden generar variabilidad entre playas (descargas locales, radiación solar, etcétera). Pero en su conjunto, los datos reflejan la dinámica oceanográfica de esta zona relevante del estuario.

La concentración de coliformes fecales fue variable, pero en todas las playas se registraron valores que excedieron el máximo estipulado en la normativa para valores puntuales (2000 UFC/100 mL). Las playas del extremo Oeste, desde Punta Espinillo hasta Punta Yeguas, presentaron en general valores moderados, con una media inferior al promedio general. Santa Catalina y la Playa del Cerro presentaron mayores valores y un alto porcentaje de excesos. La playa Ramírez se sitúa en una posición geográfica intermedia con características diferenciales de orientación y forma de la playa. Al ser una bahía cerrada, propicia la retención de la contaminación que recibe, y se observaron valores de coliformes fecales elevados y un gran porcentaje de excesos. Las playas de la región Este, desde Pocitos a Miramar, presentaron en promedio valores de coliformes fecales intermedios y similares. La playa del Puerto del Buceo representa una excepción con valores muy superiores de coliformes fecales, está localizada dentro de un recinto portuario deportivo y actualmente permanece como no habilitada para baños.

Los mecanismos que explican esta diferencia geográfica en el comportamiento de las concentraciones de coliformes fecales están dados por los tipos y el esquema de la red de saneamiento metropolitano, la densidad poblacional en las microcuencas, y la circulación dentro y entre playas (Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, 2020). Las

playas del Oeste reciben aportes de fuentes de agua contaminadas de forma directa, pues esa región no posee un esquema de saneamiento centralizado, que está actualmente en desarrollo (Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, 2020). Las playas del Este reciben en mayor medida el efecto del transporte del agua contaminada proveniente del colector subacuático y los aportes puntuales generados por la descarga de los aliviaderos (Figura 1). Estos hechos generan una predictibilidad diferencial para las playas sujetas a diferentes sistemas de tratamiento. En la zona Oeste, existe mayor variabilidad en los aportes, que son puntuales y dispersos en el territorio y, por lo tanto, más difíciles de predecir. En la zona Este, se observa una menor variabilidad entre playas, tanto en las condiciones ambientales como en la concentración de los coliformes. El efecto de la descarga centralizada de todos los aportes de la cuenca por el colector, luego del tratamiento, promedia los aportes de las microcuencas (barrios) y el transporte de la circulación oceanográfica a mesoescala (decenas de km) costera termina definiendo el efecto en las playas. Esta variabilidad de mecanismos fue bien capturada por el abordaje de modelización utilizado de AA. En este esquema de modelización es posible agregar nuevas variables, como las descargas de los aliviaderos, o la altura de marea, que podrían mejorar la capacidad predictiva, pues son variables que afectan directamente la carga de contaminación que reciben los cuerpos de agua y que no fueron incorporadas en la presente formulación.

La estrategia de modelización presentada permite avanzar en la capacidad predictiva de los excesos de coliformes fecales. Se alcanzó una mejora del 60% en la tasa de verdaderos positivos (TVP) respecto a la línea de base basada en precipitación. En playas con situaciones de contaminación comprometida (PA, SC, RAM), el modelo presentó un incremento importante en la capacidad de predicción de excesos, aumentando la TVP respecto a la línea de base en un factor de 4 en Playa Nacional y Santa Catalina, y un factor de 2 en Ramírez. De los algoritmos evaluados y las estrategias de tratamiento de los datos se desprende que los bosques aleatorios con muestreo estratificado (RFst) fueron los que presentaron mejor desempeño y superaron en todas las métricas los pronósticos generados por la línea de base. Las máquinas de vectores soporte y Adaboost fueron competitivos cuando las clases fueron balanceadas artificialmente mediante upsampling y SMOTE. Esto es esperable debido a que los algoritmos son "voraces" en el sentido de maximizar el porcentaje de aciertos, pero no consideran el acierto en las clases particulares (Breiman, 2001; Segura, et al., 2017). Esta voracidad es problemática cuando la clase minoritaria tiene una importancia superlativa, pues implica no exponer a los bañistas a niveles excesivos de contaminación. El bosque aleatorio con muestreo estratificado aumentó la capacidad de predicción en todas las métricas y en particular en la clase de Excesos, mejorando con respecto a las técnicas de remuestreo (por ejemplo, downsampling) o de incremento artificial de la clase

minoritaria (por ejemplo, SMOTE). Este resultado es relevante, y sugiere que en bases de datos donde la clase mayoritaria presenta casos poco informativos, la estratificación que realiza el algoritmo de RFst permite utilizar toda la información disponible, mientras que los algoritmos de downsampling o SMOTE no permiten capturar toda la riqueza de la información, pues los datos se remuestran con técnicas rígidas, sin aprovechar todo el conjunto de la información. El balanceo de datos para obtener mejores predicciones cuando los problemas son desbalanceados es un área en constante desarrollo y crecimiento (Kuhn y Johnson, 2016).

El algoritmo RFst presenta gran eficiencia computacional, pues el entrenamiento de un RFst con aproximadamente 19000 casos y clase minoritaria de 8% tiene un tiempo de ejecución en un computador portátil con i7 y 16Gb de memoria RAM de unos 5 segundos. La predicción luego de entrenado el modelo con 3000 nuevos casos es instantánea. En este sentido, es más eficiente que los algoritmos que requieren ajustes secuenciales, como Adaboost o aquellos que requieren un tratamiento de datos previo mediante, por ejemplo, upsampling o SMOTE, pues incrementan artificialmente el número de datos y por lo tanto el costo computacional. La eficiencia computacional del RFst permite que el algoritmo sea ejecutado sin la necesidad de grandes plataformas de cómputo. Esto es importante en un contexto de aplicación del modelo (por ej. en otras intendencias departamentales) o en oficinas descentralizadas, pues permite su manejo aún en condiciones de escasa capacidad computacional operativa.

Los algoritmos programados en el software "Virtual Beach" de la agencia de protección ambiental de USA (EPA-EEUU) tuvieron una baja performance, y en el caso del Boosting no fue posible ejecutarlos pues el modelo no convergió dadas las probabilidades iniciales de las clases. Estos resultados resaltan la importancia del desarrollo de algoritmos y modelos que contemplen los aspectos específicos de las bases de datos locales, y que la aplicación de modelos producidos en otros contextos, en general, generan soluciones que no son satisfactorias y no son adecuadas a la realidad local. Esto es aún más crítico en el área ambiental, donde se requiere un equipo de profesionales que posea una visión holística del tema y pueda interactuar entre saberes para desarrollar soluciones integrales. En Uruguay, actualmente existen profesionales altamente capacitados en estas áreas, y a partir de la descentralización de la Universidad de la República en particular, se han desarrollado equipos con una visión interdisciplinaria del ambiente que permiten aventurar un salto en la generación de conocimiento y desarrollo de estas técnicas y sus aplicaciones.

En resumen, el presente trabajo aportó a sintetizar información relevante sobre el estado de las playas. Los algoritmos de aprendizaje automático,

entrenados con una excelente base de datos histórica generada por la IM, permiten predecir eventos de contaminación y representan un insumo importante para la gestión de las playas y el cuidado de la salud humana. Incluir estos algoritmos en un esquema de ciudades inteligentes es inmediato. Asimismo, la inteligencia artificial o el conjunto de métodos para hacer "ciudades inteligentes" requiere que los objetivos de gestión estén integrados y reconozcan el valor de una buena calidad ambiental como forma de disminuir las desigualdades en el acceso a los bienes naturales.

## AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Calidad Ambiental de la Intendencia de Montevideo, y en especial a Jimena Risso y Bruno D'Alessandro por su apoyo en todo el proyecto y la generación de la base de datos. Se agradece a la ANII por el apoyo al proyecto titulado "Predicción de coliformes fecales en playas capitalinas de interés turístico", (código FSDA\_1\_2017\_1\_142164), del Fondo Sectorial de Análisis de Datos de la ANII, cuyos responsables fueron AMS y GP.

## REFERENCIAS

- American Public Health Association, American Water Works Association y Water Environment Federation, 2012. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 22a ed. Washington: APHA. Standard Method. 9222 E, Approved 2015.
- Avila, R., Horn, B., Moriarty, E., Hodson, R. y Moltachanova E., 2018. Evaluating statistical model performance in water quality prediction. En: *Journal of Environmental Management*, 206, pp.910–919. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.11.049>
- Bedri, Z., Corkery, A., O'Sullivan, J.J., Deering, L.A., Demeter, K., Meijer, W.G., O'Hare, G. y Masterson, B., 2016. Evaluating a microbial water quality prediction model for beach management under the revised EU Bathing Water Directive. En: *Journal of Environmental Management*, 167, pp.49–58. DOI: [10.1016/j.jenvman.2015.10.046](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.10.046)
- Bouchalová, M., Wennberg, A. y Tryland, I., 2013. Impact of rainfall on bathing water quality—a case study of Fiskevollbukta, Inner Oslofjord, Norway. En: *Vann*, 4, pp.491–498.
- Bourel, M., Crisci, C. y Martínez, A., 2017. Consensus methods based on machine learning techniques for marine phytoplankton presence–absence prediction. En: *Ecological Informatics*, 42, pp.46–54. DOI: [10.1016/j.ecoinf.2017.09.004](https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2017.09.004)

- Bourel, M. y Segura, A.M., 2018. Multiclass classification methods in ecology. En: *Ecological Indicators*, 85, pp.1012–1021. DOI: [10.1016/j.ecolind.2017.11.031](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.11.031)
- Breiman, L., 2001. Random forests. En: *Machine Learning*, 45(1), pp.5–32.
- Brooks, W.R., Fienen, M.N. y Corsi, S.R., 2013. Partial least squares for efficient models of fecal indicator bacteria on Great Lakes beaches. En: *Journal of Environmental Management*, 114, pp.470–475. DOI: [10.1016/j.jenvman.2012.09.033](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.09.033)
- Brooks, W., Corsi, S., Fienen, M. y Carvin, R., 2016. Predicting recreational water quality advisories: a comparison of statistical methods. En: *Environ. Model. Softw.*, 76, pp.81–94. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2015.10.012>
- Calliari, D., Gómez, M. y Gómez, N., 2005. Biomass and composition of the phytoplankton in the Río de la Plata estuary: large scale distribution and relationship with environmental variables during a Spring cruise. En: *Continental Shelf Research*, 25(2), pp.197–210. DOI: [10.1016/j.csr.2004.09.009](https://doi.org/10.1016/j.csr.2004.09.009)
- Chawla, N.V., Bowyer, K.W., Hall, L.O. y Kegelmeyer, W.P., 2002. SMOTE: Synthetic Minority Over-sampling Technique. En: *Journal of Artificial Intelligence Research*, 16, pp.321–357. DOI: [10.1613/jair.953](https://doi.org/10.1613/jair.953)
- Conde, D., Arocena, R. y Rodríguez-Gallego, L., 2002. Recursos acuáticos superficiales de Uruguay: ambientes algunas problemáticas y desafíos para la gestión. En: *AMBIOS*, III(10), pp.5-9 y IV(11), pp.32-33.
- Crisci, C., Ghattas, B. y Perera, G., 2012. A review of supervised machine learning algorithms and their applications to ecological data. En: *Ecological Modelling*, 240, pp.113–122. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2012.03.001>
- Crisci, C., Terra R., Pacheco, J.P., Ghattas, B., Bidegain, M., Goyenola, G., Lagomarsino, J.J., Méndez, G. y Mazzeo, M. 2017. Multi-model approach to predict phytoplankton biomass and composition dynamics in a eutrophic shallow lake. En: *Ecological Modelling*, 360, pp.80-93. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2017.06.017>
- Cutler, D.R., Edwards, T.C., Beard, K.H., Cutler, A., Hess, K.T., Gibson, J. y Lawler, J.J., 2007. Random forests for classification in ecology. En: *Ecology*, 88(11), pp.2783–2792. DOI: [10.1890/07-0539.1](https://doi.org/10.1890/07-0539.1)

- Cyterski, M., Brooks, W., Galvin, M., Wolfe, K., Carvin, R., Roddick, T., Fienen, M. and Corsi, S., 2014. *Virtual Beach 3.0.6: user's guide* [En línea]. [s.l.]: USEPA. [Consulta: 9 de junio de 2019]. Disponible en: [https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-03/documents/vb3\\_manual\\_3.0.6.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-03/documents/vb3_manual_3.0.6.pdf)
- Eregno, F.E., Tryland, I., Tjomsland, T., Myrmel, M., Robertson, L. y Heistad, A., 2016. Quantitative microbial risk assessment combined with hydrodynamic modelling to estimate the public health risk associated with bathing after rainfall events. En: *The Science of the Total Environment*, 548–549, pp.270–279. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2016.01.034](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.034)
- Giampaoli, S. y Spica, V.R., 2014. Health and safety in recreational waters. En: *Bulletin of the World Health Organization*, 92(2), pp.79–79. DOI: [10.2471/BLT.13.126391](https://doi.org/10.2471/BLT.13.126391)
- Gorfinkiel, D., 2006. The economic valuation of coastal areas: the case of Uruguay. En: *Ocean Yearbook*, 20(1), pp.411–434. DOI: <https://doi.org/10.1163/22116001-90000115>
- Hastie, T.J., Tibshirani, R.J. y Friedman, J.H., 2009. *The elements of statistical learning: data mining, inference, and prediction*. Nueva York: Springer. (Springer Series in Statistics).
- Heaney, C.D., Sams, E., Wing, S., Marshall, S., Brenner, K., Dufour, A.P. y Wade, T.J., 2009. Contact with beach sand among beachgoers and risk of illness. En: *American Journal of Epidemiology*, 170(2), pp.164–172. DOI: <https://doi.org/10.1093/aje/kwp152>
- He, L. y He, Z., 2008. Water quality prediction of marine recreational beaches receiving watershed baseflow and stormwater runoff in Southern California, USA. En: *Water Research*, 42, pp.2563–2573. DOI: [10.1016/j.watres.2008.01.002](https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.01.002)
- Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, s.d. *Clima* [En línea]. Montevideo: INIA. [Consulta: 13 de mayo de 2021]. Disponible en: <http://www.inia.uy/gras/Clima/>
- Intendencia de Montevideo, 2019. *Programa de monitoreo de agua de playas y costa del departamento de Montevideo. Informe anual 2018-2019* [En línea]. Montevideo: Intendencia de Montevideo. [Consulta: 12 de abril de 2020]. Disponible en: [https://montevideo.gub.uy/sites/default/files/biblioteca/informeannualcalidaddeaguadelacosta-2018-2019\\_0.pdf](https://montevideo.gub.uy/sites/default/files/biblioteca/informeannualcalidaddeaguadelacosta-2018-2019_0.pdf)

- Jones, R.M., Liu, L. y Dorevitch, S., 2013. Hydrometeorological variables predict fecal indicator bacteria densities in freshwater: data-driven methods for variable selection. En: *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(3), pp.2355–2366. DOI: [10.1007/s10661-012-2716-8](https://doi.org/10.1007/s10661-012-2716-8)
- Kruk, C., Dobroyan, M., Segura, A.M., Balado, I., Trabal, N., Piccini, C., Sampognaro, L., De Leon, F., Rodríguez, A., y Verrastro, N. 2019. Calidad de agua y su percepción en playas: La Paloma, Rocha [En línea]. En: AUGM. // *Congreso de Agua, Ambiente y Energía*. Montevideo, Uruguay (25-27 de setiembre de 2019). Montevideo: Uruguay. [Consulta: 13 de mayo de 2021]. Disponible en: [https://www.fing.edu.uy/imfia/congresos/caae/assets/trabajos/37\\_Calidad\\_de\\_agua\\_y\\_su\\_percepci%C3%B3n\\_en\\_playas\\_La\\_Paloma\\_Rocha.pdf](https://www.fing.edu.uy/imfia/congresos/caae/assets/trabajos/37_Calidad_de_agua_y_su_percepci%C3%B3n_en_playas_La_Paloma_Rocha.pdf)
- Kruk, C., Dobroyan, M., González, L., Segura, A.M., Balado, I., Trabal, N., De León, F., Martínez, G., Rodríguez, A., Piccini, C., Chalar, G. y Verrastro, N., 2018. Calidad de agua y salud ecosistémica en playas recreativas de la Paloma, Rocha [En línea]. En: *Revista Trama*, 9(9), pp.1-10. [Consulta: 13 de mayo de 2021]. Disponible en: <http://www.auas.org.uy/trama/index.php/Trama/article/view/179>
- Kruk, C., Piccini, C., Segura, A., Nogueira, L., Carballo, C., Martínez de la Escalera, G., Calliari, D., Ferrari, G., Simoens, M., Cea, J., Alcántara, I., Vico, P. y Miguez, D., 2015. Herramientas para el monitoreo y sistema de alerta de floraciones de cianobacterias nocivas: Río Uruguay y Río de la Plata. En: *INNOTEC*, (10), pp.23–39. DOI: <https://doi.org/10.26461/10.02>
- Kruk, C., Segura, A.M., Nogueira, L., Alcántara, I., Calliari, D., Martínez de la Escalera, G., Carballo, C., Cabrera, C., Sarthou, F., Scavone, P. y Piccini, C., 2017. A multilevel trait-based approach to the ecological performance of *Microcystis aeruginosa* complex from headwaters to the ocean. En: *Harmful Algae*, 70, pp.23–36. DOI: [10.1016/j.hal.2017.10.004](https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.10.004)
- Kuhn, M. y Johnson, K., 2016. *Applied predictive modeling*. 5ta. imp. cor. Nueva York: Springer.
- Lotze, H.K., Lenihan, H.S., Bourque, B.J., Bradbury, R.H., Cooke, R.G., Kay, M.C., Kidwell, S.M., Kirby, M.X., Peterson, C.H. y Jackson, J.B.C., 2006. Depletion, degradation, and recovery potential of estuaries and coastal seas. En: *Science*, 312, pp.1806-1809. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1128035>
- Mara, D. 2013. *Domestic wastewater treatment in developing countries* [En línea]: Londres: Earthscan. [Consulta: 13 de mayo de 2021]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/287291244\\_Domestic\\_Wastewater\\_Treatment\\_in\\_Developing\\_Countries#fullTextFileContent](https://www.researchgate.net/publication/287291244_Domestic_Wastewater_Treatment_in_Developing_Countries#fullTextFileContent)

- Martínez de la Escalera, G., Kruk, C., Segura, A.M., Nogueira, L., Alcántara, I. y Piccini, C., 2017. Dynamics of toxic genotypes of *Microcystis aeruginosa* complex (MAC) through a wide freshwater to marine environmental gradient. En: *Harmful Algae*, 62, pp.73–83. DOI: [10.1016/j.hal.2016.11.012](https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.11.012)
- Meteomanz.com, s.d. *Meteomanz.com* [En línea]. [s.l.]: [s.n.]. [Consulta: 13 de mayo de 2021]. Disponible en: <http://meteomanz.com/>
- Park, Y., Kim, M., Pachepsky, Y., Choi, S.H., Cho J.G., Jeon, J. y Cho, K.H., 2018. Development of a nowcasting system using machine learning approaches to predict fecal contamination levels at recreational beaches in Korea. En: *Journal of Environment Quality*, 47(5), pp.1094-1102. DOI: [10.2134/jeq2017.11.0425](https://doi.org/10.2134/jeq2017.11.0425)
- Parkhurst, D.F., Brenner, K.P., Dufour, A.P. y Wymer, L.J., 2005. Indicator bacteria at five swimming beaches—analysis using random forests. En: *Water Research*, 39(7), pp.1354–1360. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.01.001>
- R Core Team, 2020. R: A language and environment for statistical computing [En línea]. Viena: R Foundation for Statistical Computing. [Consulta: 30 de marzo de 2021]. Disponible en: <http://www.r-project.org/index.html>
- Sabino, R., Rodrigues, R., Costa, I., Carneiro, C., Cunha, M., Duarte, A., Faria, N., Ferreira, F.C., Gargaté, M.J, Júlio, C., Martins, M.L., Nevers, M.B., Oleastro, M., Solo-Gabriele, H., Veríssimo, C., Viegas, C., Whitman, R.L. y Brandão, J., 2014. Routine screening of harmful microorganisms in beach sands: implications to public health. En: *Science of The Total Environment*, 472, pp.1062–1069. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2013.11.091](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.091)
- Savichtcheva, O. y Okabe, S., 2006. Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. En: *Water Research*, 40(13), pp.2463–2476. DOI: [10.1016/j.watres.2006.04.040](https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.04.040)
- Searcy, R.T., Taggart, M., Gold, M. y Boehm, A.B., 2018. Implementation of an automated beach water quality nowcast system at ten California oceanic beaches. En: *Journal of Environmental Management*, 223, pp.633–643. DOI: [10.1016/j.jenvman.2018.06.058](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.06.058)
- Segura, A.M., Piccini, C., Nogueira, L., Alcántara, I., Calliari, D. y Kruk, C., 2017. Increased sampled volume improves *Microcystis aeruginosa* complex (MAC) colonies detection and prediction using Random Forests. En: *Ecological Indicators*, 79, pp.347–354. DOI: [10.1016/j.ecolind.2017.04.047](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.04.047)

- Shively, D.A., Nevers, M.B., Breitenbach, C., Phanikumar, M.S., Przybyla-Kelly, K., Spoljaric, A.M. y Whitman, R.L., 2016. Prototypic automated continuous recreational water quality monitoring of nine Chicago beaches. En: *Journal of Environmental Management*, 166, pp.285–293. DOI: [10.1016/j.jenvman.2015.10.011](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.10.011)
- Simionato, C.G., Clara Tejedor, M.L., Campetella, C., Guerrero, R. y Moreira, D., 2010. Patterns of sea surface temperature variability on seasonal to sub-annual scales at and offshore the Río de la Plata estuary. En: *Continental Shelf Research*, 30(19), pp.1983–1997. DOI: [10.1016/j.csr.2010.09.012](https://doi.org/10.1016/j.csr.2010.09.012)
- Thoe, W. y Lee, J.H.W., 2014. Daily forecasting of Hong Kong beach water quality by multiple linear regression models. En: *Journal of Environmental Engineering*, 140(2). DOI: [10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0000800](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000800)
- United States Environmental Protection Agency, 2019. *Virtual beach* [En línea]. [s.l.]. USEPA. [Consulta: 28 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.epa.gov/ceam/virtual-beach-vb>
- Uruguay. Decreto 253/979, de 09 de mayo de 2009. *Diario Oficial*, 31 de mayo de 1979, p.1473.
- Uruguay. Ministerio de Ambiente, Dirección Nacional de Medio Ambiente, 2017. Técnica de filtración por membrana 5053UY. En: Uruguay. Ministerio de Ambiente, Dirección Nacional de Medio Ambiente. *Manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales* [En línea]. Montevideo: DINAMA. [Consulta: 12 de marzo de 2021]. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ambiente/politicas-y-gestion/manual-procedimientos-analiticos-para-muestras-ambientales-tercera-edicion-2017>.
- Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, 2020. *Plan nacional de saneamiento* [En línea]. Montevideo: MVOTMA. [Consulta: 30 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ambiente/politicas-y-gestion/planes/plan-nacional-saneamiento>
- Uruguay. Resolución S/N del 25 de febrero de 2005. *Diario Oficial*, 2 de marzo de 2005, p.543.
- Vapnik, V., 1998. *Statistical learning theory*. Nueva York: John Wiley and Sons, Inc.

- Wade, T.J., Calderon, R.L., Brenner, K.P., Sams, E., Beach, M., Haugland, R. y Dufour, A.P., 2008. High sensitivity of children to swimming-associated gastrointestinal illness: results using a rapid assay of recreational water quality. En: *Epidemiology*, 19(3), pp.375-383. DOI: [10.1097/EDE.0b013e318169cc87](https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e318169cc87)
- WHO, 2018. *WHO recommendations on scientific, analytical and epidemiological developments relevant to the parameters for bathing water quality in the Bathing Water Directive (2006/7/EC)*. [s.n.]: WHO.
- Zepp, R.G., Cyterski, M., Parmar, R., Wolfe, K., White, E.M. y Molina, M., 2010. *Predictive modeling at beaches. Volume II: predictive tools for beach notification*. Washington: USEPA.
- Zhang, Z., Deng, Z. y Rusch, K.A., 2015. Modeling fecal coliform bacteria levels at gulf coast beaches. En: *Water Quality, Exposure and Health*, 7(3), pp.255–263. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12403-014-0145-3>

## ANEXO

**Tabla S1.** Resumen de las principales características de las 21 playas capitalinas analizadas ordenadas de Oeste a Este. CF refiere a densidad de coliformes fecales (UFC/100 mL) y a los estadísticos mínimo (Mín), máximo (Máx), la mediana (Med) y el promedio aritmético (Prom). El número de casos (N) y el número de excesos (E; cuando CF > 2000 UFC/100 mL). Las variables ambientales registradas en el agua temperatura (T), turbidez (Turb) y salinidad (S) junto con los estadísticos descriptivos (Ds= desvío estándar).

| Playa* | CF Mín | CF Máx | CF Med | CF Prom | N    | E   | T Mín | T Máx | T Prom | T Ds | Turb. Mín | Turb. Máx | Turb. Prom | Turb. Ds | S Mín | S Máx. | S Prom. | S Ds |
|--------|--------|--------|--------|---------|------|-----|-------|-------|--------|------|-----------|-----------|------------|----------|-------|--------|---------|------|
| PE     | 5      | 6000   | 25     | 101     | 433  | 2   | 8.8   | 29.2  | 21.4   | 4.1  | 2.8       | 310.0     | 37.4       | 32.0     | 0.0   | 27.8   | 3.8     | 4.9  |
| LC     | 5      | 10000  | 50     | 198     | 1059 | 18  | 8.8   | 29.2  | 19.5   | 4.9  | 2.2       | 650.0     | 43.3       | 47.2     | 0.0   | 30.0   | 3.6     | 4.6  |
| PB     | 5      | 47000  | 90     | 339     | 1119 | 24  | 6.8   | 29.2  | 19.0   | 5.0  | 1.1       | 811.0     | 45.9       | 60.3     | 0.0   | 31.0   | 4.4     | 5.3  |
| Z      | 5      | 11000  | 40     | 210     | 570  | 12  | 10.3  | 29.2  | 22.8   | 2.5  | 2.1       | 450.0     | 34.8       | 34.7     | 0.0   | 30.0   | 5.2     | 5.9  |
| PY     | 5      | 5000   | 94     | 204     | 404  | 5   | 8.9   | 28.9  | 21.6   | 3.9  | 2.6       | 370.0     | 36.2       | 40.2     | 0.1   | 33.0   | 7.8     | 7.2  |
| SC     | 5      | 98000  | 620    | 2317    | 1135 | 275 | 8.8   | 29.2  | 19.6   | 4.9  | 1.8       | 1000.0    | 44.0       | 61.8     | 0.1   | 31.5   | 7.1     | 7.2  |
| PN     | 5      | 3400   | 130    | 260     | 645  | 6   | 8.8   | 29.2  | 21.4   | 4.2  | 2.0       | 303.0     | 34.5       | 34.3     | 0.4   | 34.0   | 7.9     | 7.5  |
| PA     | 5      | 99000  | 550    | 1550    | 1169 | 224 | 7.1   | 30.3  | 19.7   | 5.0  | 1.7       | 1000.0    | 46.7       | 59.6     | 0.1   | 31.6   | 8.2     | 7.5  |
| RAM    | 5      | 51000  | 480    | 1432    | 1179 | 190 | 8.4   | 32.1  | 19.8   | 5.1  | 1.6       | 800.0     | 46.0       | 65.8     | 0.1   | 33.5   | 8.8     | 7.9  |
| POC    | 5      | 13400  | 375    | 715     | 1168 | 86  | 8.5   | 29.3  | 19.5   | 4.8  | 1.1       | 1000.0    | 86.8       | 89.2     | 0.1   | 33.6   | 11.5    | 8.1  |
| POCB   | 5      | 8300   | 360    | 618     | 1003 | 63  | 8.8   | 29.2  | 19.4   | 4.9  | 2.8       | 684.5     | 86.7       | 85.7     | 0.1   | 32.2   | 10.9    | 7.9  |
| PPB    | 5      | 1E+06  | 705    | 8390    | 550  | 159 | 10.3  | 29.2  | 22.8   | 2.6  | 2.8       | 600.0     | 81.0       | 75.8     | 0.3   | 31.4   | 11.7    | 7.8  |
| BUC    | 4      | 2E+05  | 390    | 1347    | 1103 | 105 | 8.8   | 29.2  | 19.6   | 4.9  | 1.6       | 900.0     | 93.7       | 95.2     | 0.1   | 31.8   | 11.9    | 8.2  |
| MAL    | 5      | 94550  | 290    | 990     | 1149 | 77  | 8.9   | 29.6  | 19.8   | 4.8  | 1.9       | 1000.0    | 98.0       | 117.6    | 0.1   | 35.0   | 12.1    | 8.4  |
| BR     | 5      | 37000  | 160    | 431     | 633  | 15  | 10.3  | 29.2  | 22.9   | 2.5  | 2.8       | 600.0     | 77.7       | 71.8     | 0.3   | 33.0   | 14.1    | 8.6  |
| H      | 5      | 51000  | 205    | 546     | 1082 | 27  | 8.8   | 29.2  | 19.7   | 4.9  | 2.6       | 750.0     | 84.4       | 96.7     | 0.1   | 36.0   | 12.4    | 8.5  |
| ING    | 5      | 78400  | 250    | 601     | 1127 | 52  | 8.8   | 29.2  | 19.6   | 4.9  | 2.1       | 1000.0    | 91.8       | 118.7    | 0.1   | 34.0   | 12.3    | 8.4  |
| VDE    | 5      | 14900  | 220    | 482     | 1086 | 47  | 8.8   | 29.2  | 19.6   | 4.9  | 2.8       | 684.5     | 85.5       | 85.0     | 0.1   | 35.5   | 12.3    | 8.5  |
| MTA    | 5      | 31000  | 130    | 432     | 545  | 13  | 10.3  | 29.2  | 22.9   | 2.5  | 2.8       | 1000.0    | 79.9       | 82.0     | 0.5   | 35.5   | 14.1    | 8.7  |
| CAR    | 5      | 36000  | 300    | 866     | 1137 | 102 | 9.1   | 30.1  | 20.0   | 4.8  | 2.3       | 1000.0    | 110.1      | 131.9    | 0.1   | 35.0   | 12.3    | 8.3  |
| MIR    | 5      | 50000  | 410    | 1099    | 1063 | 137 | 8.8   | 29.2  | 19.6   | 4.9  | 2.8       | 600.0     | 86.1       | 83.5     | 0.1   | 34.0   | 12.4    | 8.3  |

\*Nombres de las playas en orden de Oeste a Este (de arriba a abajo en la tabla): Punta Espinillo, La Colorada, Pajas Blancas, Zabala, Punta Yeguas, Santa Catalina, Nacional, Cerro, Ramírez, Pocitos en Barreiro, Pocitos en Av. Brasil, Puerto del Buceo, Buceo, Malvín, Brava, Honda, Ingleses, Verde, Mulata, Carrasco, Miramar. (ver informes con descripción detallada en el Programa de monitoreo de agua de playas y costa del departamento de Montevideo. Informe anual 2018-2019 (Intendencia de Montevideo, 2019).



# Las floraciones de cianobacterias tóxicas comprometen el uso del agua del Río Negro, Uruguay

## Toxic cyanobacterial blooms compromise the use of the Río Negro water, Uruguay

## Blooms de cianobactérias tóxicas comprometem o uso da água do Rio Negro, Uruguai

Sylvia Bonilla<sup>1,2\*</sup> <https://orcid.org/0000-0002-1772-9899>

Luis Aubriot<sup>1,2</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9673-6853>

Signe Haakonsson<sup>1,2</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8205-3672>

Mariana Illarze<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9286-9384>

Ismael Díaz<sup>4</sup> <https://orcid.org/0000-0003-3176-1753>

Beatriz Brena<sup>1,3</sup> <https://orcid.org/0000-0002-8056-7167>

\*Autor de contacto: [sbon@fcien.edu.uy](mailto:sbon@fcien.edu.uy)

<sup>1</sup>Grupo de Ecología y Fisiología de Fitoplancton.

<sup>2</sup>Sección Limnología, IECA, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

<sup>3</sup>Área Bioquímica, Facultad de Química, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

<sup>4</sup>Laboratorio de Desarrollo Sustentable y Gestión Ambiental del Territorio, IECA, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

**Recepción:** 6 Abril 2021 **Aprobación:** 12 Octubre 2021

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución NoComercial 4.0 Internacional.

**Resumen:** Las floraciones de cianobacterias tóxicas generan impactos negativos a nivel ambiental, económico, y en la salud humana y animal. Se realizó un análisis de datos históricos (1989-2020, n = 423) y un experimento de enriquecimiento de nutrientes para estudiar las cianobacterias del Río Negro, principal río interno del país. En base a indicadores cuantitativos (biovolumen, abundancia de células de cianobacterias y observación visual), se definieron cuatro niveles de peligrosidad de exposición a cianobacterias tóxicas. Las cianobacterias más frecuentes (*Microcystis* sp. y *Dolichospermum* sp.) son productoras potenciales de diversas toxinas, incluyendo algunas que no han sido analizadas aún en Uruguay. Se advierte un deterioro ambiental creciente desde el año 2000, pautado por el aumento de la biomasa de cianobacterias y las concentraciones de toxinas (microcistinas). Los nutrientes en el agua indican eutrofización avanzada, asociada al incremento del área agrícola de la cuenca. Los resultados experimentales demostraron el papel clave de los nutrientes y el tiempo de residencia en el favorecimiento de estos organismos. Las floraciones tóxicas de cianobacterias amenazan seriamente los múltiples servicios ecosistémicos que brinda el río, siendo indispensable la instrumentación de planes de monitoreo de cianobacterias y medidas de manejo para controlar la eutrofización a largo plazo.

**Palabras clave:** calidad de agua, eutrofización, embalses, nutrientes, fitoplancton.

**Abstract:** Toxic cyanobacterial blooms generate negative environmental, economic, and health impacts. We carried out an analysis of historical limnological data (1989-2020, n = 423) and we performed a nutrient enrichment experiment to study the cyanobacteria of Río Negro, the largest internal river of Uruguay. We defined four hazard levels of exposure to toxic cyanobacteria based on quantitative indicators (biovolume and abundance of cyanobacterial cells and visual observation). The most common cyanobacteria (*Microcystis* sp. and *Dolichospermum* sp.) are potential producers of various toxins, including some that have not yet been analyzed in Uruguay. Accelerating environmental deterioration since 2000 has been shown by an increase of cyanobacteria biomass and concentrations of toxins (microcystins). Nutrient concentrations indicated advanced eutrophication, associated with the increase in the area devoted to agriculture of the watershed. Experimental results demonstrated the key role of nutrients and residence time in favoring these organisms. Toxic cyanobacterial blooms seriously threaten the multiple ecosystem services provided by the river, making it essential to implement cyanobacteria monitoring, and management plans to control eutrophication in the long term.

**Keywords:** water quality, eutrophication, reservoirs, nutrients, phytoplankton.

**Resumo:** B blooms de cianobactérias tóxicas geram impactos ambientais e econômicos negativos, além de danos à saúde humana e animal. Análise de dados históricos (1989-2020, n = 423) e um experimento de enriquecimento de nutrientes foram realizados para estudar as cianobactérias do Río Negro, o principal rio interno do Uruguai. Com base em indicadores quantitativos (biovolume e abundância de células cianobacterianas e observação visual) foram definidas quatro categorias de perigosidade de exposição a

toxinas. As cianobactérias mais comuns (*Microcystis* sp. e *Dolichospermum* sp.) são produtoras potenciais de várias toxinas, algumas das quais nunca foram analisadas em Uruguai. Elevadas biomassas de cianobactérias e concentrações das toxinas (microcistinas) foram encontradas desde 2000 com tendência a aumentar casos em categorias de alta perigosidade e alertando para a deterioração ambiental, a última década. Concentrações altas de nutrientes na água indicam eutrofização avançada associado com o aumento da área da bacia dedicada à agricultura. Os resultados experimentais demonstraram o papel fundamental dos nutrientes e do tempo de residência no favorecimento de cianobactérias. A proliferação de cianobactérias tóxicas ameaçam seriamente os múltiplos serviços ecossistêmicos fornecidos pelo rio, tornando essencial a implementação de monitoramento de cianobactérias, planos de manejo e monitoramento para controlar a eutrofização em longo prazo.

**Palavras-chave:** qualidade da água, eutrofização, reservatórios, nutrientes, fitoplâncton.

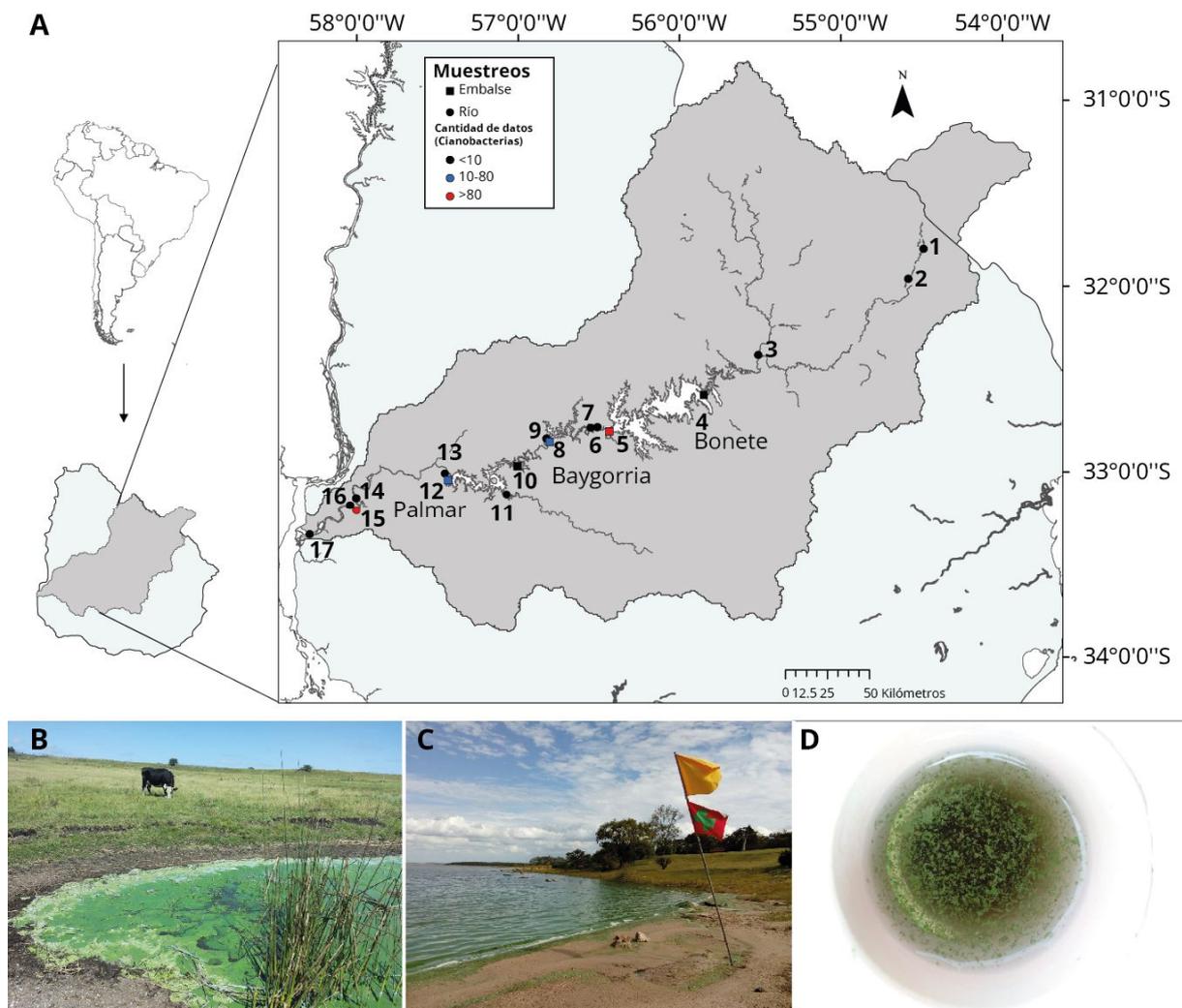
## INTRODUCCIÓN

A nivel global, la agricultura es el principal factor asociado a la eutrofización de los ecosistemas acuáticos continentales, debido al aporte de nutrientes al agua derivados de la fertilización (Moss, 2008; Ramankutty, et al., 2018). Una de las principales consecuencias de la eutrofización es la aparición de altas acumulaciones de biomasa de cianobacterias (floraciones) (Huisman, et al., 2018), que alteran el olor y el sabor del agua, y pueden producir distintos tipos de cianotoxinas peligrosas para la salud humana y animal (van Apeldoorn, et al., 2007). Las floraciones tienen impactos negativos para la sociedad, como aumentos en los costos de potabilización, restricciones para el riego, cierre de zonas recreativas, o incluso el impedimento total del uso del agua (Paerl y Otten, 2013; Chorus y Welker, 2021).

En los ecosistemas lóticos, las actividades antrópicas que afectan el flujo y la circulación natural del agua generan condiciones propicias para las floraciones (Palmer y Ruhi, 2019). Por ejemplo, la construcción de embalses para la generación de energía eléctrica es una práctica muy extendida en América del Sur (Tundisi, et al., 1998; Palmer y Ruhi, 2019). En los embalses, el tiempo de residencia controlado artificialmente cumple un papel importante en la acumulación y el lavado de la biomasa de fitoplancton aguas abajo (Davis y Koop, 2006; Rangel, et al., 2012).

El Río Negro es el principal cuerpo de agua lótico interno de Uruguay, con un caudal promedio de  $930 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$  (cerca de la desembocadura), y atraviesa el territorio de este a oeste, confluyendo en el río Uruguay (Alonso, et al., 2019)

(Figura 1). Su cuenca (68.200 km<sup>2</sup>) ocupa el 39% del territorio del país y acoge actividades como la ganadería extensiva, la agricultura (secano: trigo, sorgo, soja y maíz; cultivos regados y frutales) y la forestación (FAO y Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, 2015; IBGE, 2018). El río se utiliza con múltiples finalidades, entre las que se destacan tres grandes represas construidas sobre el cauce principal: Rincón del Bonete (de ahora en adelante lo llamaremos “Bonete”) (1.070 km<sup>2</sup>), Baygorria (100 km<sup>2</sup>) y Palmar (320 km<sup>2</sup>) (Figura 1), que generan el 38% (~593 MW) de la energía hidroeléctrica del país (Chalar, et al., 2014; Patrone, 2014). Los tres embalses difieren en su profundidad ( $Z_{\max}$  aproximada: 30, 25 y 30 m, Aubriot com. pers.) y tiempo de residencia (196, 14 y 50 días, promedios 2009-2016, para Bonete, Baygorria y Palmar, respectivamente) (Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, DINAMA, 2018). Los caudales varían según la estación, siendo mayores generalmente en otoño e invierno (Chalar, et al., 2014). El régimen de lluvias y el manejo de los embalses condiciona la dinámica del tiempo de residencia, mayor generalmente en Bonete (fuertemente regido por el manejo) y menor en Baygorria, siendo un embalse de paso entre los otros (Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, DINAMA, 2018). El agua del río también se utiliza para potabilización, riego, pesca artesanal, cultivo de esturión, recreación y como abrevadero para el ganado (Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, DINAMA, 2018). Los valores de nutrientes en el agua (nitrógeno y fósforo) indican un estado hipereutrófico en los embalses (promedios del período 2009-2013: 114 y 725  $\mu\text{gL}^{-1}$ , para fósforo total y nitrógeno total, respectivamente) (Alonso, et al., 2019; Cunha, et al., 2013), en sintonía con las tendencias generales registradas en las principales cuencas hidrográficas del país (Chalar, 2009; Bonilla, et al., 2015; Aubriot, et al., 2017; Chalar, et al., 2017; Kruk, et al., 2019). Se han registrado floraciones de cianobacterias tóxicas en los embalses antes mencionados y en playas del río (Chalar, et al., 2014; González-Piana, et al., 2017, 2018), muchas veces formando espumas visibles a simple vista o desde imágenes satelitales (Aubriot, et al., 2020).



**Figura 1.** Mapa del Río Negro y su cuenca (área gris), Uruguay, con los sitios de estudio (1 a 17), los colores indican el número de datos disponibles (ver inserto con los códigos) (A). Fotos (B: E. Font, 11/03/2015, y C y D: L. Aubriot, 22/03/2021): espuma de cianobacterias en predio ganadero, Bonete (B), y en playa de Palmar, con bandera sanitaria (C). Cianobacterias en muestra de Palmar (D).

Dadas estas condiciones, la instalación de una planta de celulosa de gran porte aguas abajo del embalse de Bonete implica grandes desafíos ambientales (UPM II, de UPM-Kymmene Corporation, Finlandia; producción estimada ~ 2 millones de toneladas secas de pasta por año) (Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, DINAMA, 2019a). Por lo tanto, es fundamental poder contar con una evaluación global del ecosistema que permita una gestión adecuada, asegurando el desarrollo sostenible y la coexistencia de diversas actividades antrópicas dependientes del río y su cuenca (Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, DINAMA, 2012). Si bien se han generado series temporales de datos limnológicos

consistentes a partir de 2009 (Uruguay. Ministerio de Medio Ambiente, 2020), no se han analizado en forma integrada a las cianobacterias y las cianotoxinas que aparecen en el río, y la influencia combinada del flujo del agua y los nutrientes como factores que inciden en las floraciones. Este trabajo tuvo dos objetivos, 1) realizar un análisis sinóptico de la información histórica sobre las cianobacterias planctónicas, las cianotoxinas y los principales parámetros ambientales en el Río Negro; y 2) mediante una aproximación experimental, evaluar el papel del tiempo de residencia y los nutrientes en el crecimiento de las poblaciones de cianobacterias y las concentraciones de microcistinas totales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Datos históricos de nutrientes, uso del suelo y cianobacterias

Los datos de la concentración de nitrógeno total (NT) y de fósforo total (PT) se obtuvieron del portal abierto Observatorio Ambiental de la DINAMA (OAN) (Uruguay. Ministerio de Medio Ambiente, 2020), con información de los embalses (Bonete: BO, Baygorria: BA y Palmar: PA) y tramos lóticos (Figura 1: todos los sitios, excepto el 15), período 2000 a 2019 ( $n = 628$  y  $616$ , NT y PT, respectivamente). Se utilizó la base de datos de la Sección Limnología (Bonilla, et al., 2015), incluyendo registros de fitoplancton, biomasa de cianobacterias, concentración de clorofila *a* (Clo *a*), datos de toxinas ( $n = 169$ ) y nutrientes totales. A dicha base de datos se incorporó información proveniente de informes técnicos, artículos referidos a la presencia de cianobacterias (Pérez, et al., 1999; Chalar, et al., 2010; González-Piana, et al., 2017, 2018; Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, DINAMA, 2018; Estudio Ingeniería Ambiental, 2019) y datos no publicados de la Sección Limnología (biovolumen de cianobacterias y microcistinas totales y sus variantes), obteniendo una matriz final con 423 registros.

Para visualizar tendencias en la concentración de nutrientes (NT y PT) a lo largo del tiempo, los datos se clasificaron por tipo de ambiente (embalses y tramos lóticos), y se calculó la mediana y los cuantiles extremos (0,10 y 0,90) para ventanas temporales entre los años en los que se contaba con información de uso del suelo (ver más abajo).

La información disponible de toxinas se restringe a microcistinas (MC) (en  $\mu\text{gL}^{-1}$  y por unidad de peso de biomasa cianobacteriana, seco:  $\mu\text{gpp.s.}^{-1}$  y fresco:  $\mu\text{gmm}^{-3}$ ), microcistinas totales (analizadas mediante la técnica ELISA) o las variantes LR, RR e YR (datos de LC MS/MS o MALDI-TOF) (Brena, et al., 2021).

Se calculó la ocurrencia de géneros y especies de cianobacterias desde los primeros registros (1991) hasta 2019, incluyendo informes con datos promediados por períodos de tiempo diversos (Conde, et al., 1999; Chalar, et al., 2010). Se utilizaron los datos del monitoreo visual de cianobacterias (tres categorías, 0: ausencia de cianobacterias, 1: presencia y 2: espuma) para las playas de la ciudad de Mercedes (tramos lóticos), 2017-2020, n = 63, datos tomados del portal OAN (Uruguay. Ministerio de Medio Ambiente, 2020; Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, DINAMA 2019b).

Recientemente, la OMS (Chorus y Welker, 2021) ha propuesto valores guía para varias cianotoxinas (MCs, cylindrospermopsina: CYNs, anatoxinas: ATXs y saxitoxinas: STXs), así como indicadores cuantitativos de cianobacterias y niveles de alerta de agua para potabilización y uso recreativo (ver Tabla 1). En base a dichos criterios, los datos de cianobacterias (indicadores cuantitativos y orientativos: monitoreo visual) se clasificaron en “categorías”, definidas en base a los umbrales de peligrosidad de exposición a cianotoxinas según el uso del agua (para potabilizar o para recreación) (Tabla 1). Los datos se clasificaron priorizando el biovolumen, luego las células y por último la concentración de la Clo *a*. Los niveles visuales, usados para el monitoreo de playas, se clasificaron de forma parsimoniosa asumiendo que el límite para detectar Clo *a* en el agua por el ojo humano es ~ 20 µgL<sup>-1</sup> (Tabla 1).

A los efectos de resumir los principales cambios en el uso del suelo a lo largo del tiempo, se analizaron las áreas de cobertura de los diferentes usos en la cuenca del Río Negro, para los años 2000, 2008, 2011, 2015 y 2018, ya que a partir de 2000 hay más información limnológica. Se discriminaron seis categorías (agricultura, agua, forestación, herbáceo-arbustivo, monte nativo y otros), donde agricultura incluye también pasturas (FAO y Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, 2015; IBGE, 2018). Para 2018 se actualizó la clasificación de 2015 mediante la clasificación de imágenes satelitales (LANDSAT 8 OLI, 2018).

**Tabla 1.** Indicadores cuantitativos de cianobacterias (Ciano) y niveles de alerta de agua para potabilización y uso recreativo, niveles de monitoreo visual DINAMA y categorías de riesgo de exposición a cianobacterias tóxicas utilizadas en este estudio (Uruguay. Ministerio de Medio Ambiente, DINAMA, 2019b). Valores conservadores: \*biovolumen = 0,3 mm<sup>3</sup>L<sup>-1</sup> o Clo *a* = 1 µgL<sup>-1</sup> (con predominio de cianobacterias) indica que las MCs o la CYN pueden alcanzar el Valor Guía crónico (de por vida) para estas toxinas en agua potable; \*\*biovolumen >4

$\text{mm}^3\text{L}^{-1}$  o Clo  $a > 12 \mu\text{gL}^{-1}$  (con predominio de cianobacterias) indica que las MCs, las CYN o STXs pueden exceder los Valores Guía de exposición de corto plazo para estas toxinas; \*\*\*biovolumen  $> 8 \text{mm}^3\text{L}^{-1}$  o Clo  $a > 24 \mu\text{gL}^{-1}$  (con predominio de cianobacterias) indica que las MCs, las CYN o STXs pueden exceder los Valores Guía de uso recreativo para estas toxinas (Chorus y Welker, 2021).

| Uso del agua   | Nivel de alerta OMS | Biovolumen Ciano; Clo $a$                                      | Células Ciano ( $\text{cellsmL}^{-1}$ ) | MC-LR $\mu\text{gL}^{-1}$    | Niveles monitoreo visual DINAMA | Categorías usadas en este estudio |
|----------------|---------------------|--|---|------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Potabilización | Vigilancia          | $< 0,3 \text{mm}^3\text{L}^{-1}$ ;<br>$< 1 \mu\text{gL}^{-1}$  | $< 5000$                                | $< 1 \mu\text{gL}^{-1}$      |                                 | <b>1</b> (Baja-Nula)              |
|                | Alerta 1*           | $0,3-4 \text{mm}^3\text{L}^{-1}$ ;<br>$1-12 \mu\text{gL}^{-1}$ | 5000-60000                              | $1-12 \mu\text{gL}^{-1*}$    |                                 | <b>2</b><br>(Baja-Media)          |
|                | Alerta 2**          | $4-8 \text{mm}^3\text{L}^{-1}$ ;<br>$12-24 \mu\text{gL}^{-1}$  | 60000-120000                            | $12-24 \mu\text{gL}^{-1***}$ |                                 | <b>3</b><br>(Media-Alta)          |
| Recreación     | Vigilancia          | $1-4 \text{mm}^3\text{L}^{-1}$ ;<br>$3-12 \mu\text{gL}^{-1}$   |   |                              | v0: ausencia                    | <b>1-2</b><br>(Baja-Media)        |
|                | Alerta 1            | $4-8 \text{mm}^3\text{L}^{-1}$ ;<br>$12-24 \mu\text{gL}^{-1}$  | $< 60000-120000$                        |                              | v1: presencia                   | <b>3</b><br>(Media-Alta)          |
|                | Alerta 2***         | $> 8 \text{mm}^3\text{L}^{-1}$ ;<br>$> 24 \mu\text{gL}^{-1}$   | $> 120000$                              | $> 24 \mu\text{gL}^{-1***}$  | v2: espuma                      | <b>4</b> (Alta)                   |

## Experimento

Se realizó un experimento para determinar la influencia de los nutrientes (nitrógeno: N y fósforo: P) y del tiempo de residencia en el crecimiento del fitoplancton. El diseño de tipo factorial incluyó dos factores, nutrientes (Nutr) y tiempo de residencia (Dilu), resultando en cuatro condiciones: control, Nutr, Dilu y Nutr\*Dilu. Las variables de respuesta fueron el biovolumen de cianobacterias y eucariotas, y las microcistinas totales.

Se utilizó una muestra subsuperficial de 20 L del embalse Palmar (27/06/2014) (Figura 1, sitio 12), que se trasladó en oscuridad y a baja temperatura al laboratorio de la Sección Limnología, en la Facultad de Ciencias (Montevideo), donde se determinó la concentración de nutrientes según Valderrama (1981) ( $98 \pm 5,8 \mu\text{gPT L}^{-1}$  y  $0,75 \pm 0,09 \text{mgNT L}^{-1}$ , N y P, respectivamente). La muestra fue homogeneizada y se distribuyeron 600 mL en frascos de vidrio de 1 L. Para el factor Nutr se usó nitrato ( $\text{NaNO}_3$ ) y fosfato ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ). Las soluciones de

nutrientes fueron dosificadas en pulsos diarios (9 adiciones, una por cada día del experimento, excepto el último). La dosis diaria fue de  $133 \mu\text{gL}^{-1}$  y  $1,02 \text{ mgL}^{-1}$  (fosfato y nitrato, respectivamente), totalizando  $1,1 \text{ mgL}^{-1}$  y  $8,2 \text{ mgL}^{-1}$ , P y N respectivamente. El tiempo de residencia bajo ( $\sim 3,4$  días) se emuló por dilución, realizando un recambio diario de 175 mL con agua de río filtrada (filtro MGF, Munktell, Alemania). El tiempo de residencia alto representó los 10 días del experimento (sin dilución). Para el tratamiento combinado, Nutr\*Dilu, la dilución diaria fue anterior al agregado de nutrientes. Las réplicas ( $n = 3$ ) se aclimataron  $\sim 40$  horas a  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $110 - 115 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y fotoperíodo 16:8, luz:oscuridad y se ordenaron al azar. Durante los 10 días de incubación se siguieron los cambios de la fluorescencia *in vivo* de la Clo *a* y la ficocianina (Cremella, et al., 2018) para calcular la tasa de crecimiento (en  $\text{día}^{-1}$ ). Al finalizar (10 días), parte de las muestras se fijaron con solución lugol para el conteo de fitoplancton, y el resto se congeló para el análisis de MC totales mediante la técnica ELISA (Brena, et al., 2021). La identificación y conteo del fitoplancton se realizó para cada unidad experimental, según métodos de rutina descritos en Illarze (2015). Las diferencias significativas entre tratamientos se probaron mediante ANOVA de una vía y una prueba de comparaciones pareadas posterior (con distancia de Holmes), verificando previamente la normalidad y homogeneidad de varianza de los datos.

Todas las gráficas y los análisis estadísticos fueron realizados con el programa libre R (3.5.3).

## RESULTADOS

### Datos históricos

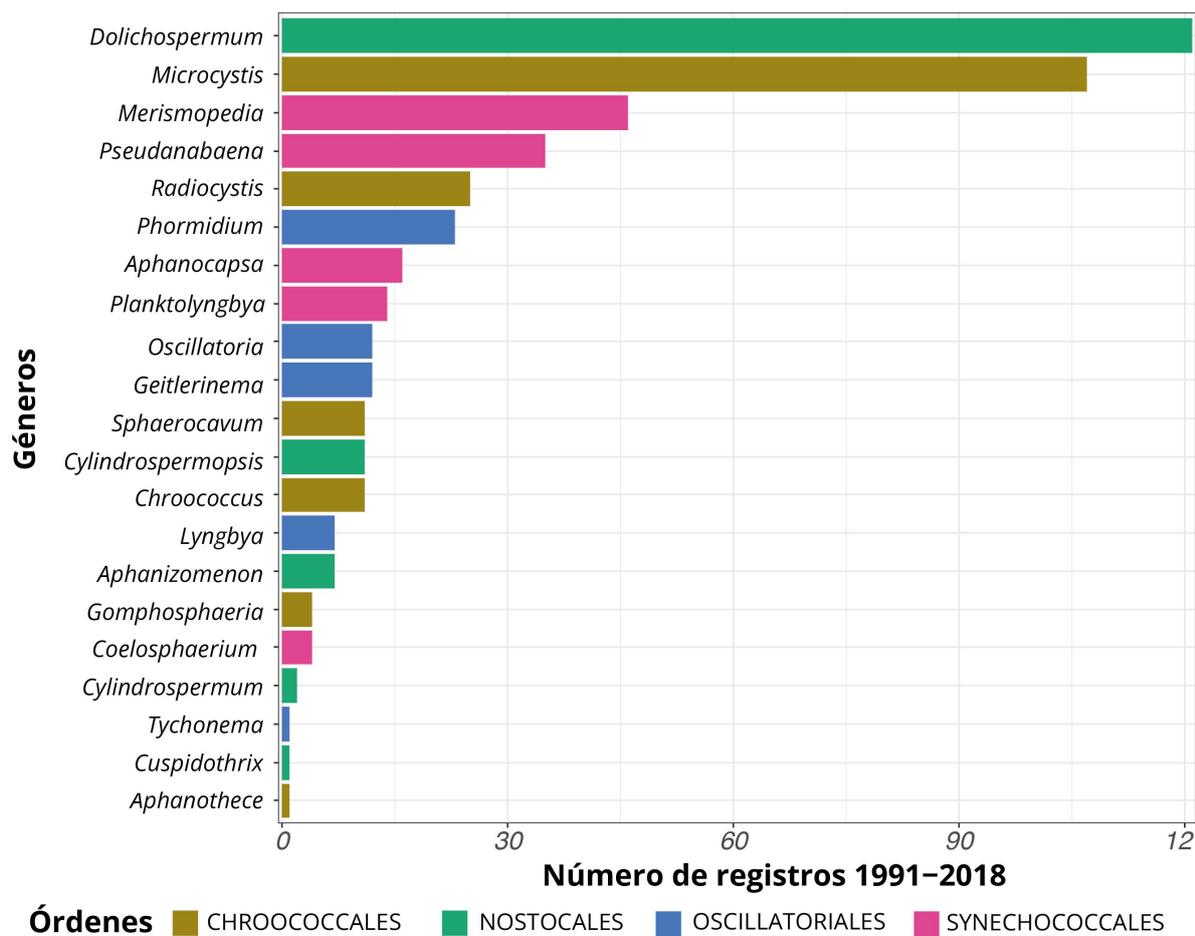
Los estudios de cianobacterias en el Río Negro comenzaron en la década de los noventa (trabajos de la Sección Limnología, incluyendo pocos datos de 1989) y continuaron a lo largo del tiempo en forma dispar. El sitio más estudiado ha sido BO ( $n = 111$ ) y los menos estudiados han sido los tramos lóticos del río (aguas arriba, entre y aguas abajo de los embalses) ( $n = 26$ , excluyendo los monitoreos visuales). Se registraron 21 géneros de cianobacterias entre 1991 y 2018, de los cuales el 57% pertenece a organismos filamentosos. El género *Dolichospermum* (orden Nostocales) fue el más frecuente, seguido de *Microcystis*, *Merismopedia*, *Pseudanabaena* y *Radiocystis* (Figura 2).

Los primeros datos cuantitativos corresponden a la concentración de Clo *a* e individuos por litro (variable que no es indicadora de biomasa ni abundancia).

Posteriormente se incorporaron las estimaciones de abundancia de cianobacterias en células (a partir del 2000) y en biovolumen (Tabla 2). El mayor número de registros con información cuantitativa de cianobacterias corresponde a los embalses a partir de 2010 (n = 187) (Tabla 2). Los valores mayores a 500  $\mu\text{gL}^{-1}$  de Clo *a* y de 100  $\text{mm}^3\text{L}^{-1}$  de biovolumen son de densas acumulaciones de biomasa de cianobacteria (“espuma”), condiciones alcanzadas en los tres embalses (Tabla 2).

Las categorías de peligrosidad de exposición a cianobacterias tóxicas (Tabla 1) permitieron evidenciar una tendencia al aumento de casos en las categorías de peligrosidad media a alta desde 1989 a 2015 (Figura 3). Desde 2017 se registraron valores que corresponden a la categoría 1-2 para aguas recreacionales, y se observó un aumento de los registros en la categoría 3 (Media-Alta) (Figura 3). Tanto en los embalses como en los tramos lóticos (entre embalses o aguas abajo de los mismos), se han reportado cianobacterias con niveles de peligrosidad altos para ambos usos del agua (categorías 3 y 4). En los tramos lóticos posteriores a BO, el biovolumen y las células de cianobacterias son generalmente un orden de magnitud más bajos que en los embalses (Tabla 2). Antes del 2010 sólo se registró un sitio lótico (desembocadura del Río Yi, enero 2001) con información de cianobacterias (Figura 3), y ninguno en el río aguas arriba de los embalses.

Las únicas toxinas que han sido analizadas en el Río Negro son las microcistinas, en general como totales, aunque hay reportes con algunas variantes químicas (Tabla 2). La información disponible apenas supera los 60 registros (MC totales y variante LR), donde el 23% de los datos de la zona pelágica y el 58% de la orilla superan los 24  $\mu\text{gL}^{-1}$  (Alerta 2, peligrosidad alta para aguas de recreación, OMS, Tabla 1). Los primeros informes de cianotoxinas correspondieron a floraciones de *Microcystis aeruginosa* y *Dolichospermum circinale* en BO (MC totales: 909 y 551  $\mu\text{ggp.s.}^{-1}$ , sitios Carpintería y Represa, respectivamente; diciembre/2000) y en los tres embalses al verano siguiente (enero/2001) (MC totales: 763; 701 y 971  $\mu\text{ggp.s.}^{-1}$  en BA, BO y PA, respectivamente y un valor casi cuatro veces más alto en el tramo lótico) (Tabla 2). La variante química de MC más analizada ha sido la LR, pero se han cuantificado puntualmente las MCs-RR (sitios 5 y 6) e YR (sitio 5) (Figura 1, Tabla 2), en presencia de una floración dominada por las cianobacterias coloniales *Radiocystis fernandoii* y *Microcystis wesenbergii* (cianobacterias totales: 1.375; 38 y 40  $\text{mm}^3\text{L}^{-1}$ , sitios 5, 6 y 7, respectivamente, noviembre/2014).



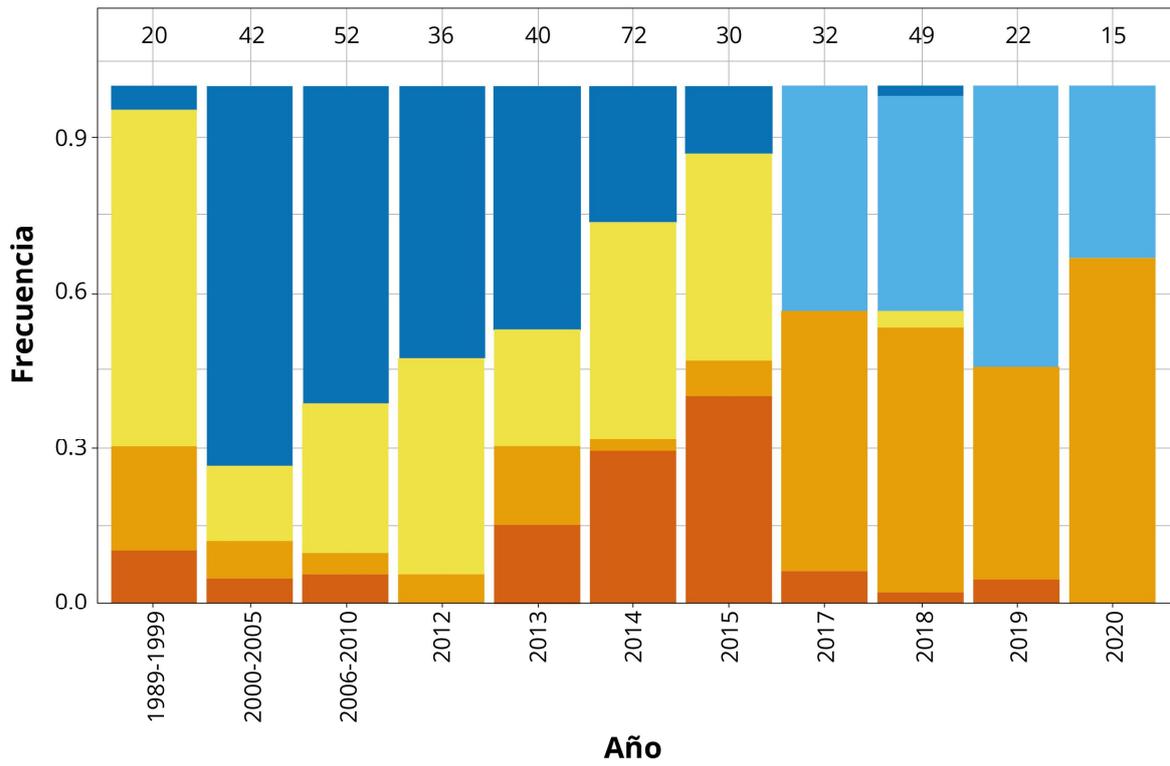
**Figura 2.** Registro de géneros de cianobacterias en los tres embalses del Río Negro. Los colores indican los cuatro órdenes filogenéticos.

**Tabla 2.** Biovolumen de cianobacterias (2010-2015) y microcistinas (MC), (2000-2001 y 2010-2015) registrados en el Río Negro, tramos lóticos (rn), embalses (Bonete, Baygorria y Palmar) y todos los datos (Todos). Se indica la mediana, el rango (mínimo-máximo, entre paréntesis rectos) y el n (cursiva); \*: n = 1, nd: analizado y no detectado. Los datos de biovolumen se discriminan según la muestra haya sido tomada en la orilla o en la zona pelágica (centro). Métodos: ELISA (MC\_totales) o LC MS/MS o MALDITOF para las variantes; <sup>a</sup>: río Yi (2000). Referencias (Ref): 1) De León, et al., 2001, 2) Conde, et al., 2002, 3) González-Piana, et al., 2011, 4) González-Piana, et al., 2017, 5) Brena, et al., 2021 y 6) este estudio.

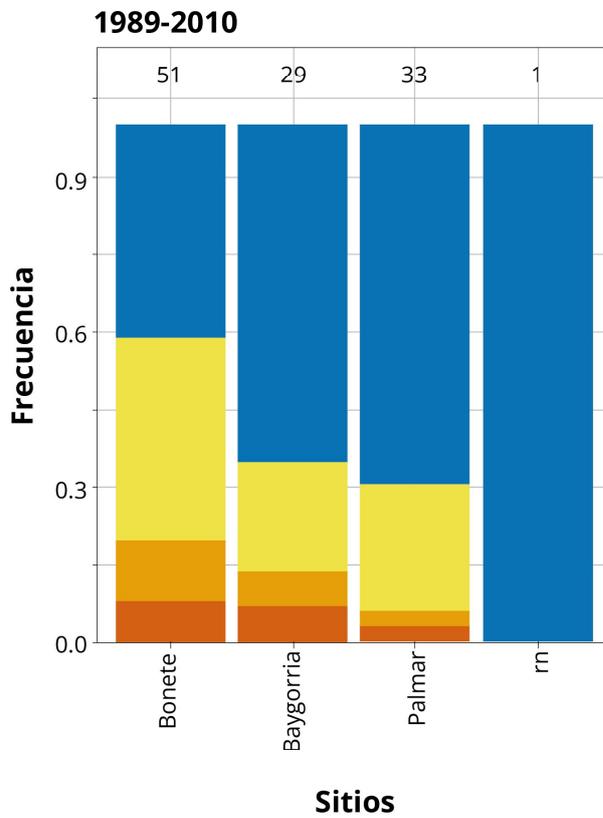
| Biovolumen o Toxinas                                      | Bonete                | Baygorria                           | Palmar                | rn                        | Todos                       | Ref     |
|---|-----------------------|-------------------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------------|---------|
| Cianobacterias (mm <sup>3</sup> L <sup>-1</sup> ), centro | 0,537 [0-1370], 99    | 0,288 [0-25,6], 75                  | 1,69 [0-48,7], 76     | 0,0236 [0,00243-40,2], 19 | 0,545 [0-1370]              | 3; 4; 6 |
| Cianobacterias (mm <sup>3</sup> L <sup>-1</sup> ), orilla | 10,4 [0,0300-1660], 8 | 992 [27,0-15300], 9                 | 0,510 [0,410-18,9], 5 | -                         | 76,2 [0,0300-15300]         | 3; 5; 6 |
| MC_totales (µg L <sup>-1</sup> )                          | 8,80 [0,610-1250], 7  | 32,0 [0,793-3x10 <sup>4</sup> ], 13 | 21,2 [2,79-3440], 4   | 0 [0-23,9], 22            | 2,95 [0-3x10 <sup>4</sup> ] | 4; 5    |
| MC_LR (µg L <sup>-1</sup> )                               | 151 [3,80-2110], 4    | 33,0 [26,6-551], 3                  | 34,0 [2,29-2660], 7   | 1,80 *                    | 33,0 [1,80-2660]            | 3; 4; 6 |
| MC_RR (µg L <sup>-1</sup> )                               | 23,6*                 | nd                                  | nd                    | 5,60*                     | -                           | 6       |
| MC_YR (µg L <sup>-1</sup> )                               | 3,60*                 | nd                                  | nd                    | nd                        | -                           | 6       |
| MC_totales (µggp.s. <sup>-1</sup> )                       | 763 [627-899], 2      | 673 [551-909], 4                    | 957 [886-1030], 2     | 2880 <sup>aa</sup>        | 886 [551-2880]              | 1; 2    |
| MC_totales/ peso fresco (µgmm <sup>-3</sup> )             | 0,174 [0,02-9,98], 5  | 0,076 [0,005-0,59], 8               | -                     | 0 [0-0,41], 10            | 0,09 [0,01-9,98]            | 6; 5    |
| MC_LR/ peso fresco (µgmm <sup>-3</sup> )                  | 0,486 [0,01-3,81], 11 | 2,154 [0,55-9,85], 6                | 0,96 [0,118-87,6], 11 | -                         | 0,69 [0,01-87,6]            | 4; 6    |

El PT en el agua presentó valores altos, por encima de los umbrales de condición eutrófica a lo largo de todo el período, tanto para embalses (excepto en 2000) como para los tramos lóticos (Figura 4). El NT presentó concentraciones muy altas con una tendencia general al aumento en los cuantiles superiores (0,90) desde 2000 a 2018 (Figura 4). El uso del suelo de la cuenca del Río Negro tuvo cambios importantes entre 2000 y 2018. Se incrementó el porcentaje de área cubierta de la cuenca destinada a la agricultura (15 al 23%) y la forestación (6 a 11%) en los años 2000 y 2018, respectivamente (Figura 4). Este cambio determinó una disminución de 960.870 hectáreas ocupadas por la cobertura herbáceo-arbustiva (del 73 al 59% del área total de la cuenca, en 2000 y 2018 respectivamente).

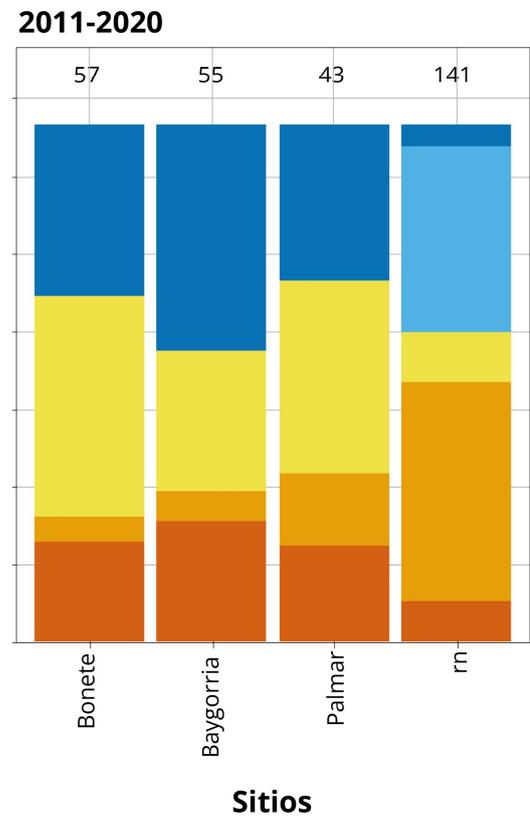
**A Todos los datos**



**B**

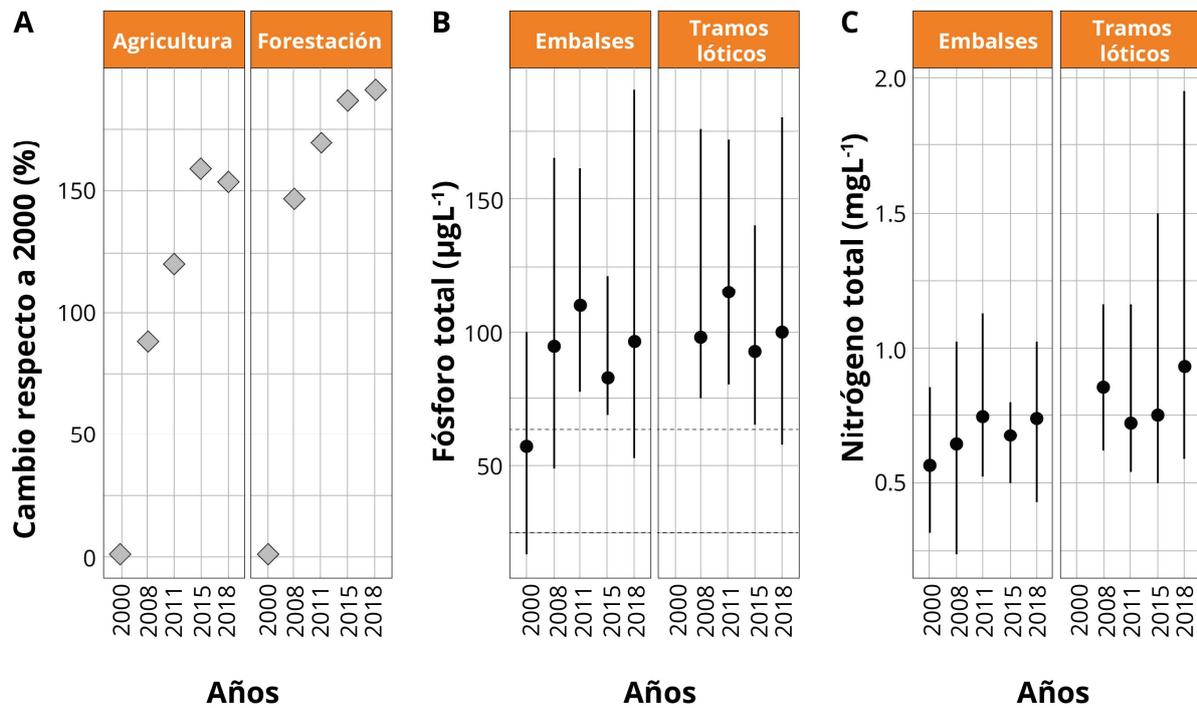


**C**



Categorías de peligrosidad 1 1\_2 2 3 4

**Figura 3.** Frecuencia de registro de floraciones en categorías de peligrosidad de exposición a cianobacterias tóxicas (ver Tabla 1). A: para todos los datos a lo largo del tiempo. Agrupado por embalses (Bonete, Baygorria y Palmar) y tramos lóticos (rn), para dos períodos, B: 1989-2010 y C: 2011-2020. n = número de datos, indicado arriba de cada barra.

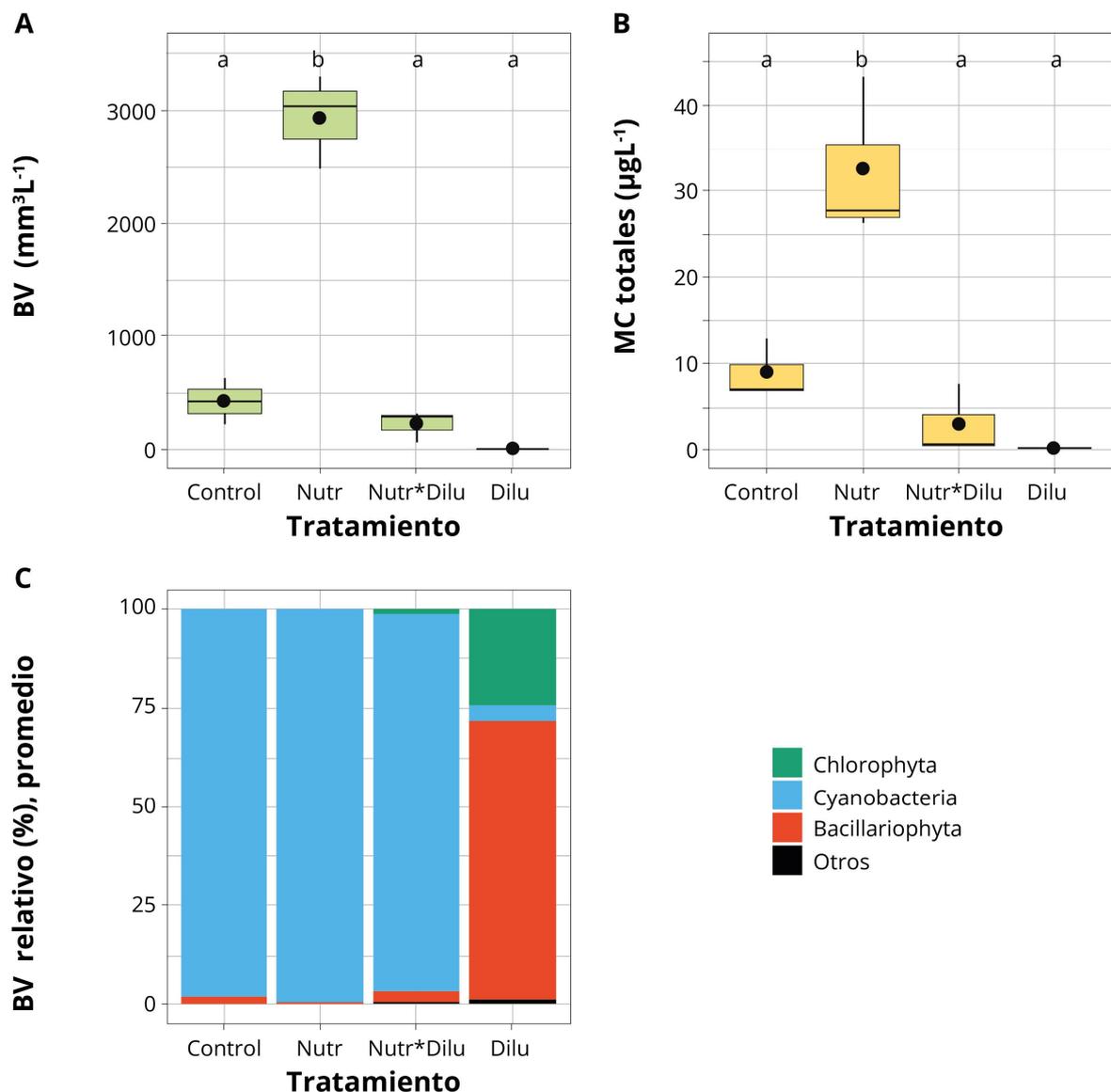


**Figura 4.** A: Cambio del uso del suelo (%) respecto al 2000 para agricultura y forestación. B: Variación de la concentración de fósforo total y C: Variación de la concentración de nitrógeno total, desde 2000 a 2018, según embalses y tramos lóticos. Se indica la mediana (círculo negro, y los cuantiles 0,10/0,90). En B las líneas horizontales punteadas: 25 y 63,7 µg·L<sup>-1</sup> de fósforo total (umbral en la legislación uruguaya y máxima para el estado eutrófico para embalses subtropicales según Cunha, et al., 2013, respectivamente).

### Experimento de nutrientes y tiempo de residencia

El agregado de nutrientes resultó en un aumento significativo del biovolumen de cianobacterias y de las MCs (Figura 5). Las cianobacterias fueron el grupo dominante en el fitoplancton (>90% del biovolumen total, género dominante: *Microcystis*), tanto en el control como en los dos tratamientos con adición de nutrientes (Nutr y Nutr\*Dilu). El biovolumen de cianobacterias del tratamiento Nutr fue, en promedio, 7 veces más alto que en el control (2.918 y 412 mm<sup>3</sup>L<sup>-1</sup>, Nutr y control, respectivamente). El tratamiento Dilu presentó una mayor

diversidad de grupos eucariotas de pequeño tamaño individual y muy baja contribución de cianobacterias (~ 3% del total), siendo 3 órdenes de magnitud menor al del control (Figura 5). Finalmente, el tratamiento Nutr\*Dilu alcanzó biovolúmenes de cianobacterias altos pero menores al control (promedio: 206  $\text{mm}^3\text{L}^{-1}$ ). Con adición de nutrientes se observaron los mayores crecimientos (0,204 y 0,153  $\text{día}^{-1}$ , Nutr y Nutr\*Dilu, respectivamente), mientras que los otros tratamientos presentaron una tasa de crecimiento muy baja (0,069 y 0,003  $\text{día}^{-1}$ , Dilu y control, respectivamente). La concentración de MCs fue significativamente más alta en Nutr que en el resto de los tratamientos (Figura 5). Sin embargo, las MCs expresadas por unidad de biomasa fueron bajas en los tratamientos con adición de nutrientes ( $0,012 \pm 0,005 \mu\text{gmm}^{-3}$  y  $0,012 \pm 0,014 \mu\text{gmm}^{-3}$ , Nutr y Nutr\*Dilu, respectivamente) y más altas en los restantes ( $0,029 \pm 0,025 \mu\text{gmm}^{-3}$  y  $1,920 \pm 1,45 \mu\text{gmm}^{-3}$ , para el control y Dilu, respectivamente).



**Figura 5.** Experimento de enriquecimiento con nutrientes y dilución en muestras naturales de PA Control (sin enriquecimiento ni dilución), Dilu: dilución diaria, Nutr: agregado de N+P, Nutr\*Dilu: ambos factores combinados. A: biovolumen total de fitoplancton, B: microcistinas totales (MC), y C: contribución relativa de los diferentes grupos en el total del biovolumen. Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ). Para cada tratamiento  $n = 3$ .

## DISCUSIÓN

Nuestro estudio permitió evidenciar la situación del Río Negro en relación con la presencia de floraciones de cianobacterias tóxicas en las últimas décadas. La tendencia temporal muestra un aumento de casos de categorías que indican peligrosidad media a alta de exposición a cianotoxinas, algunas que no han sido estudiadas aún en el país, lo que representa un alto riesgo para el uso del agua con diferentes fines.

### Tendencias temporales de la biomasa y toxinas de cianobacterias, y el uso del suelo en el Río Negro

La mayoría de las floraciones estuvieron dominadas por *Dolichospermum* y *Microcystis* (o *Radiocystis*), las cianobacterias más frecuentes en los cuerpos de agua lénticos y lóticos eutróficos del país (Bonilla, et al., 2015; Ferrari, et al., 2011; Haakonsson, et al., 2017). Estos taxa son potencialmente tóxicos, y pueden producir lipopolisacáridos (dermatotoxinas), microcistinas (hepatotoxinas) y potentes neurotoxinas (saxitoxina, anatoxina-a y anatoxina-a(S)) (van Apeldoorn, et al., 2007; Furtado, et al., 2009). La mayoría de las neurotoxinas no se analizan en parte por limitaciones en la capacidad analítica del país, por lo que puede existir un riesgo ambiental y sanitario que aún no ha sido identificado apropiadamente.

Las concentraciones de cianobacterias (células y biovolumen) compiladas en nuestro trabajo indican condiciones eutróficas a hipereutróficas (Chorus y Welker, 2021), particularmente en los embalses. La mayoría de los estudios corresponden al período estival, aunque floraciones de cianobacterias también han sido registradas en otoño-invierno en los embalses (Chalar, et al., 2010, 2014), por lo que la problemática se extiende a períodos fríos, generalmente indicados como poco favorables para las floraciones. Si bien el conocimiento de las cianobacterias en los tramos lóticos del río es muy limitada y fragmentada, no se han registrado en la cuenca alta (antes de los embalses) (Pérez, 2002 y datos de este estudio). Por otro lado, las cianobacterias circulan por el río a

partir del embalse BO, mediado por las precipitaciones y el manejo de los embalses, y son transportadas a PA, donde ocurre el aumento de la biomasa y su posterior descarga hacia el río Uruguay, e incluso a cientos de kilómetros de distancia como el Río de la Plata y Océano Atlántico (Kruk, et al., 2019; Aubriot, et al., 2020).

Las concentraciones de microcistinas alcanzaron valores extremadamente altos en muestras provenientes de espuma de cianobacterias, señalando una elevada peligrosidad para bañistas, pescadores y animales domésticos. Recientemente se han detectado MCs en la sangre de ganado que abrevaba en el Río Negro (BO y BA) con presencia de floraciones (Brena, et al., 2021), lo que podría derivar en un perjuicio económico directo para la ganadería y la salud animal. En cuanto a las variantes químicas encontradas en el agua, la LR fue la reportada con mayor frecuencia, en línea con estudios anteriores (Brena, et al., 2021). En este estudio, los valores promedio de MC por biovolumen (peso fresco) indican toxicidad media (valores promedios para MC totales y LR: 0,024 - 3,25  $\mu\text{ggp.s.}^{-1}$ , asumiendo  $1\text{mm}^3 = 0,25\text{ p.s.}$ ) respecto a los rangos encontrados en la literatura (máximos  $\sim 9\ \mu\text{ggp.s.}^{-1}$ ) (Chorus y Welker, 2021). Sin embargo, los primeros reportes conocidos (2001) tienen valores cercanos a  $1\ \text{mggp.s.}^{-1}$  (De León, et al., 2001), lo que puede deberse al análisis de espumas cianobacterianas. Los valores y las tendencias de MCs comprometen el uso del agua en general e indican la necesidad de incrementar los monitoreos de estos organismos. Diversos métodos, de alta frecuencia y de bajos costos, pueden proporcionar información orientativa o semi-cuantitativa en tiempo real, como el monitoreo visual en zonas de recreación de la ciudad de Mercedes (sitio 15, Figura 1) (Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente; DINAMA, 2019b), el monitoreo remoto o la medición de la fluorescencia de pigmentos *in vivo* (Cremella, et al., 2018; Aubriot, et al., 2020).

Los valores de nutrientes totales registrados en el Río Negro (2000-2018) indican condiciones eutróficas a hipereutróficas (valores de fósforo total  $>63,7\ \mu\text{gL}^{-1}$ , Cunha, et al., 2013). Dichas concentraciones son mayores a los promedios históricos del río Uruguay y algo menores a los del río Santa Lucía, ecosistemas lóticos del país fuertemente impactados (Aubriot, et al., 2017; Alonso, et al., 2019). Los valores de fósforo total registrados en este estudio fueron entre 2 y 18 veces mayores que el permitido por la legislación uruguaya ( $25\ \mu\text{gL}^{-1}$ , excepto para la Clase 4), Decreto 253/979 (Uruguay, 1979). Esto, junto a los índices de estado trófico, indican un grado de deterioro muy importante en la calidad del agua. Las concentraciones de nitrógeno total fueron altas y con una tendencia en ascenso desde 2000 a 2018, lo que puede estar relacionado al aumento de la

agricultura en la cuenca y la tendencia mundial a usar fertilizantes nitrogenados (Glibert, et al., 2014).

El aumento en la agricultura varía según regiones de la cuenca, siendo más importante en el Este que en el Centro y Oeste (100% y 10-50%, Este, y Centro y Oeste, respectivamente, período 2011-2015) (Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente; DINAMA, 2018), asociado a la expansión de monocultivos de soja y forestación (Gazzano, et al., 2019). Las cargas de PT y NT aportadas por los cultivos han sido estimadas en 50% de la carga total en la región Este y Centro (cuenca alta y media), y en más del 80% en cuenca media a baja (Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente; DINAMA, 2018). Considerando que las fuentes puntuales de PT y NT son relativamente bajas en esta cuenca (1,2% y 2,2%, PT y NT, respectivamente, para 2015-2016) (Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, DINAMA, 2018), emprendimientos industriales de gran porte (ejemplo: UPM II, planta de pasta de celulosa) pueden alterar esta tendencia. Se estima que esta planta volcará al río aproximadamente 38 y 168 Ton.año<sup>-1</sup> de PT y NT, respectivamente, al inicio de su funcionamiento (Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, DINAMA, 2019a). Modelaciones realizadas por DINAMA indican que la frecuencia de floraciones algales se incrementaría, al menos en BA, en períodos de bajo caudal (<65 m<sup>3</sup>s<sup>-1</sup>) (Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, DINAMA, 2019a). Sin embargo, se desconocen los efectos que podría tener la descarga de UPM II aguas abajo (embalse PA). Las cargas de nutrientes aportadas por UPM II en períodos de bajos caudales y en períodos cálidos (alta temperatura y luz) podrían generar un impacto significativo en el aumento de la frecuencia y persistencia de floraciones de cianobacterias. Estas variaciones además estarán regidas por el régimen de precipitaciones que afectará al caudal.

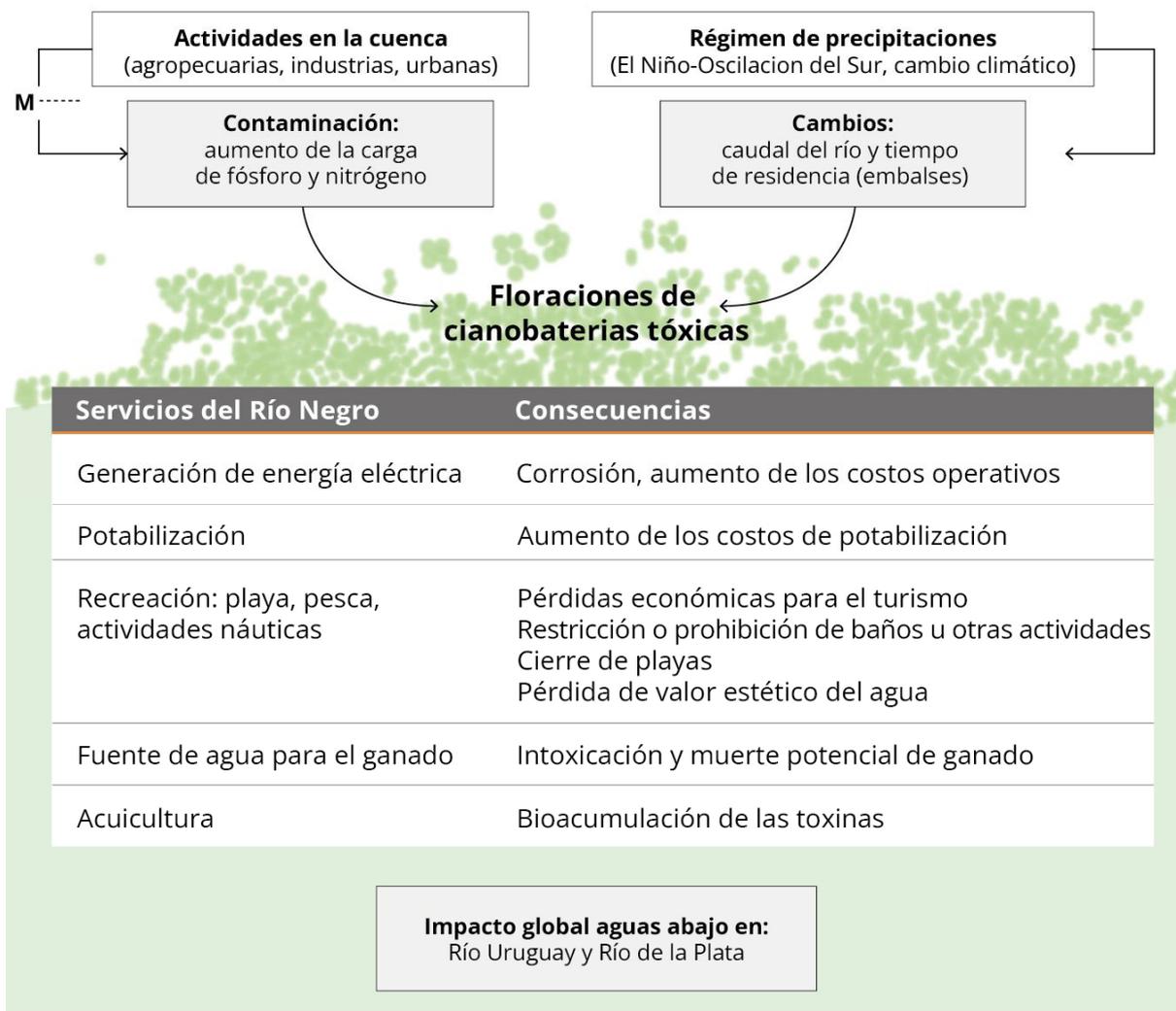
### **Efectos de los nutrientes y el tiempo de residencia en la biomasa y las microcistinas**

Nuestros resultados experimentales evidenciaron el efecto combinado de los nutrientes y el tiempo de residencia del agua en la acumulación de altas biomasa de cianobacterias. La muestra natural de PA utilizada tenía características eutróficas (ver Materiales y Métodos), pero aun así el agregado de nutrientes generó un aumento del biovolumen de fitoplancton 7 veces mayor al control, con dominancia de cianobacterias tóxicas. Esto implica que, bajo condiciones apropiadas de temperatura y luz, un aumento de aportes de nutrientes puede derivar en un agravamiento de la situación en el ecosistema

(Maavara, et al., 2015). Las altas concentraciones de cianobacterias estuvieron acompañadas de un aumento de la concentración de MC totales, indicando alta peligrosidad de exposición para humanos (Chorus y Welker, 2021). En los tratamientos con dilución, que emulan las condiciones lóxicas, la baja biomasa se explica por la acción del lavado diario; por lo tanto, se demostró el papel clave de las condiciones léxicas en la formación de las floraciones de cianobacterias. El tiempo de residencia del agua del río (~ horas a pocos días) es mayor al tiempo de crecimiento fitoplanctónico (~ 3 día<sup>-1</sup> en condiciones naturales) (Huisman, et al., 2018), lo que limita la acumulación de biomasa de cianobacterias de gran tamaño individual. Sin embargo, el represamiento de los ríos aumenta el tiempo de residencia, permitiendo entonces el crecimiento y la acumulación de biomasa (Davis y Koop, 2006). El lavado de dicha biomasa depende del manejo de los embalses, pero también del régimen de precipitaciones afectadas por el evento de escala regional El Niño/a Oscilación del Sur (ENSO, por sus siglas en inglés), muchas veces generando situaciones complejas o imposibles de controlar (Aubriot, et al., 2020). Los pronósticos de cambio climático para la región incluyen aumentos en la frecuencia de fenómenos de precipitaciones extremos (sequías y lluvias), lo que puede influir de forma significativa en el fenómeno de las floraciones (Haakonsson, et al., 2017).

### Implicancias de las floraciones tóxicas para el uso del agua con fines múltiples

La cuenca del Río Negro se ha visto afectada por un aumento de actividades productivas, lo que se refleja en los valores y las tendencias de los resultados de nuestro estudio. El aumento de la frecuencia y severidad de las floraciones tóxicas en los embalses en la última década alerta sobre la situación crítica del Río Negro y las posibles consecuencias en los servicios ecosistémicos que ofrece (Figura 6). La eutrofización de los ecosistemas límnicos en Uruguay data de varias décadas (Conde y Sommaruga, 1999; Bonilla, et al., 2015; Aubriot, et al., 2017; Goyenola, et al., 2021), y está asociada al aporte de fuentes difusas como la agricultura, de fuentes puntuales (por ejemplo, lechería, frigoríficos) y de aportes urbanos sin tratamientos adecuados de los efluentes (Barreto, et al., 2017; Chalar, et al., 2017; Arocena, et al., 2018). Las predicciones de cambio climático pronostican un aumento de eventos meteorológicos extremos que modificarán la circulación del agua y el aporte de nutrientes desde la cuenca, actuando en sinergia con la eutrofización (Figura 6) y favoreciendo las floraciones (Paerl, 2017; Haakonsson, et al., 2017). Las pérdidas económicas derivadas de los efectos de la eutrofización pueden llegar a ser muy elevadas (Dodds, et al., 2009), por lo que son imprescindibles los planes de manejo tendientes a reducir el aporte de nutrientes al agua (Steffensen, 2008; Sinha, et al., 2019; Goyenola, et al., 2021) para revertir la situación en el río.



**Figura 6.** Principales causas de las floraciones de cianobacterias tóxicas (cajas blancas), los efectos en el agua (cajas grises) y las consecuencias en los servicios que brinda el río (cuadro inferior). La línea punteada indica donde se deberían tomar acciones de manejo (M) para disminuir el aporte de nutrientes.

## CONCLUSIONES

Mediante la integración de la información histórica de campo y los resultados experimentales, nuestro estudio logró poner en evidencia la gravedad de la situación actual de la eutrofización del Río Negro. Las floraciones de cianobacterias tóxicas representan un riesgo elevado para la salud humana y animal, y para otros servicios ecosistémicos. Nuestros resultados alertan que la situación puede empeorar, agravada por el efecto del cambio climático. Esto derivaría en consecuencias negativas para la sociedad y la economía si no se

toman medidas que reviertan la tendencia actual. Es necesario contar con más estudios experimentales que permitan identificar la causalidad e intensificar la frecuencia de los monitoreos ambientales, incluyendo la medición de las cianobacterias (análisis taxonómico, cuantificación de biomasa, observación visual, pigmentos *in vivo*, y teledetección) y de las toxinas. El trabajo conjunto entre la academia y los tomadores de decisión es esencial para lograr una gestión adecuada a largo plazo que permita revertir la situación actual y asegure el desarrollo sostenible del Río Negro.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por ANII (FCE-6384) y DINAMA (Convenios 2013-2016 y 2020). Parte de los resultados son de la Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas de M. Illarze. A M. C. Pérez, B. Cremella, A. Somma y E. Font por la asistencia técnica en campo y laboratorio; y a C. Leite Sant'Anna por las correcciones del portugués.

## REFERENCIAS

- Alonso, J., Quintans, F., Taks, J., Conde, D., Chalar, G., Bonilla, S., et. al., 2019. Water Quality in Uruguay: Current status and challenges. En: *Water Quality in the Americas. Risks and Opportunities*. Mexico: IANAS, pp.561–597.
- Arocena, R., Chalar, G. y Pacheco, J.P., 2018. Agriculture and elevation are the main factors for Pampasic stream habitat and water quality. En: *Environmental Monitoring and Assessment*, 190, 254. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6622-6>
- Aubriot, L., Zabaleta, B., Bordet, F., Sienra, D., Risso, J., Achkar, M. y Somma, A., 2020. Assessing the origin of a massive cyanobacterial bloom in the Río de la Plata (2019): Towards an early warning system. En: *Water Research*, 181, pp.115944. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115944>
- Aubriot, L.E., Delbene, L., Haakonsson, S., Somma, A., Hirsch, F. y Bonilla, S., 2017. Evolución de la eutrofización en el Río Santa Lucía: influencia de la intensificación productiva y perspectivas. En: *INNOTEC*, 14, pp.7–16. DOI: <https://doi.org/10.26461/14.04>
- Barreto, P., Dogliotti, S. y Perdomo, C., 2017. Surface water quality of intensive farming areas within the Santa Lucia River basin of Uruguay. En: *Air, Soil and Water Research*, 10, pp.1–8. DOI: <https://doi.org/10.1177/1178622117715446>.

- Bonilla, S., Haakonsson, S., Somma, A., Gravier, A., Britos, A., Vidal, L., De León, L., Brena, B., Pírez, M., Piccini, C., Martínez de la Escalera, G., Chalar, G., González-Piana, M., Martigani, M. y Aubriot, L., 2015. Cianobacterias y cianotoxinas en ecosistemas límnicos de Uruguay. En: *INNOTEC*, 10, pp.9–22.
- Brena, B.M., Font, E., Pírez Schirmer, M., Badagian, N., Cardozo, E., Pérez-Parada, A. y Bonilla, S., 2021. Microcystin ELISA in water and animal serum for an integrated environmental monitoring strategy. En: *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. DOI: <https://doi.org/10.1080/03067319.2021.1881073>
- Chalar, G., 2009. The use of phytoplankton patterns of diversity for algal bloom management. En: *Limnologica*, 39(3), pp.200–208. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.limno.2008.04.001>
- Chalar, G., Fabián, D., González, M. y Delbene, L., 2010. *Limnología de los embalses del Río Negro: Noviembre 2000 – Marzo 2009. Informe* [En línea]. Montevideo: Sección Limnología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. [Consulta: 5 de febrero de 2021]. Disponible en: <http://limno.fcien.edu.uy/pactuales/Rio%20Negro%20Informe%202000-2009.pdf>
- Chalar, G., Gerhard, M., González-Piana, M. y Fabián, D., 2014. Hidroquímica y eutrofización en tres embalses subtropicales en cadena. En: Marchovecchio, J.E., Botté, S.E., Freije, R.H., eds. *Procesos geoquímicos superficiales en Sudamérica*. Bahía Blanca: SiFyQA, pp.121-148.
- Chalar, G., Garcia-Pesenti, P., Silva-Pablo, M., Perdomo, C., Olivero, V. y Arocena, R., 2017. Weighting the impacts to stream water quality in small basins devoted to forage crops, dairy and beef cow production. En: *Limnologica*, 65, pp.76–84. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.limno.2017.06.002>
- Chorus, I. y Welker, M., 2021. *Toxic cyanobacteria in water*. 2nd ed. Boca Ratón: CRC Press. DOI: <https://doi.org/10.1201/9781003081449>
- Conde, D., Gorga, J., Clemente, J., Paradiso, M., De león, L. y Lacerot, G., 1999. *Calidad de agua en el embalse Rincón del Bonete, período 1994-1999. Informe final* [En línea]. Montevideo: FCIEN, UTE. [Consulta: 2 de febrero de 2021]. Disponible en: <http://limno.fcien.edu.uy/cd/html/public/pdf/infotec/Conde-et-al1999-Bonete-InformeResumenejecutivo.pdf>
- Conde, D., Paradiso, M., Gorga, J., Brugnoli, E., De León, L. y Mandiá, M., 2002. *Problemática de la calidad de agua en el sistema de grandes embalses del Río Negro (Uruguay)* [En línea]. Montevideo: CIER 39, pp.51–68. [Consulta: 2 de febrero de 2021]. Disponible en: <http://limno.fcien.edu.uy/cd/html/public/pdf/articulos/Conde-et-al-CIER2002.pdf>
- Conde, D. y Sommaruga, R., 1999. A review of the state of Limnology in Uruguay. En: Gopal, J., Wetzel, R., eds. *Limnology in developing countries 2*. New Delhi:

International Scientific Publications/SIL. pp.1–31.

- Cremella, B., Huot, Y. y Bonilla, S., 2018. Interpretation of total phytoplankton and cyanobacteria fluorescence from cross-calibrated fluorometers, including sensitivity to turbidity and colored dissolved organic matter. En: *Limnology and Oceanography: Methods*, 16(12), pp.881–894. DOI: <https://doi.org/10.1002/lom3.10290>
- Cunha, D.G.F., Calijuri, M.do C. y Lamparelli, M.C., 2013. A trophic state index for tropical/subtropical reservoirs (TSI<sub>tr</sub>). En: *Ecological Engineering*, 60, pp.126–134. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.07.058>
- Davis, J.R. y Koop, K., 2006. Eutrophication in Australian rivers, reservoirs and estuaries – a southern hemisphere perspective on the science and its implications. En: *Hydrobiologia*, 599(1), pp.23–76. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10750-005-4429-2>
- De León, L., Paradiso, M., Brugnoli, E., Gorga, J. y Conde, D., 2001. *II Muestreo de toxicidad y II Muestreo de calidad de agua en los embalses del Río Negro*. Montevideo: Sección Limnología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. (Informe inédito).
- Dodds, W.K., Bouska, W.W., Eitzmann, J.L., Pilger, T.J., Pitts, K.L., Riley, A.J., Schloesser, J.T. y Thornbrugh, D.J., 2009. Eutrophication of U. S. freshwaters: Analysis of potential economic damages. En: *Environmental Science and Technology*, 43(1), pp.12–19. DOI: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es801217q>
- Estudio Ingeniería Ambiental, 2019. *Informe técnico. Respuesta a SIC14- Ecosistemas acuáticos II. Informe técnico. CUECAR S.A. Y BLANVIRA S.A. Exp. 2018/14000/011210*. Montevideo: EIA. [Consulta: 20 de enero de 2021]. Disponible en: [https://www.ambiente.gub.uy/oan/wp-content/uploads/2018/02/22.1-Respuesta-SIC-14-Ecosistemas-acu%C3%A1ticos-II\\_en.pdf](https://www.ambiente.gub.uy/oan/wp-content/uploads/2018/02/22.1-Respuesta-SIC-14-Ecosistemas-acu%C3%A1ticos-II_en.pdf)
- FAO y Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, 2015. *Atlas de cobertura del suelo del Uruguay: cobertura del suelo y detección de cambios 2000-2011* [En línea]. Montevideo: MVOTMA. [Consulta: 15 de noviembre de 2020] Disponible en: <http://www.fao.org/3/i4372s/i4372s.pdf>
- Ferrari, G., Pérez, M. del C., Dabezies, M., Míguez, D. y Saizar, C., 2011. Planktic Cyanobacteria in the Lower Uruguay River, South America. En: *Fottea*, 11(1), 225–234.
- Furtado, A.L.F.F., Calijuri, M.D.C., Lorenzi, A.S., Honda, R.Y., Genuário, D.B. y Fiore, M.F., 2009. Morphological and molecular characterization of cyanobacteria from a Brazilian facultative wastewater stabilization pond and evaluation of microcystin production. En: *Hydrobiologia*, 627(1), pp.195–209. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10750-009-9728-6>

- Gazzano, I., Achkar, M. y Diaz, I., 2019. Agricultural transformations in the southern cone of Latin America: Agricultural intensification and decrease of the aboveground net primary production, Uruguay's case. En: *Sustainability*, 11(24), 7011. DOI: <https://doi.org/10.3390/su11247011>
- Glibert, P.M., Maranger, R., Sobota, D.J. y Bouwman, L., 2014. The Haber Bosch-harmful algal bloom (HB-HAB) link. En: *Environmental Research Letters*, 9(10). DOI: <https://doi.org/10.1088/1748-9326/9/10/105001>
- González-Piana, M., Fabian, D., Delbene, L. y Chalar, G., 2011. Toxics blooms of *Microcystis aeruginosa* in three Río Negro reservoirs, Uruguay. En: *Harmful Algal News*, 43, pp.16–17.
- González-Piana, M., Fabián, D., Piccardo, A. y Chalar, G., 2017. Dynamics of total Microcystin LR concentration in three subtropical hydroelectric generation reservoirs in Uruguay, South America. En: *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 99(4), pp.488–492. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2158-7>
- González-Piana, M., Piccardo, A., Ferrer, C., Brena, B., Pírez, M., Fabián, D. y Chalar, G., 2018. Effects of wind mixing in a stratified water column on toxic cyanobacteria and Microcystin-LR distribution in a subtropical reservoir. En: *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 101, pp.611–616. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2446-x>
- Goyenola, G., Kruk, C., Mazzeo, N., Nario, A., Perdomo, C., Piccini, C., y Meerhoff, M. 2021. Producción, nutrientes, eutrofización y cianobacterias en Uruguay: armando el rompecabezas. En: *INNOTEC*, 22, pp.1–33. DOI: <https://doi.org/10.26461/22.02>
- Haakonsson, S., Rodríguez-Gallego, L., Somma, A. y Bonilla, S., 2017. Temperature and precipitation shape the distribution of harmful cyanobacteria in subtropical lotic and lentic ecosystems. En: *Science of the Total Environment*, 609, pp.1132–1139. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.067>
- Huisman, J., Codd, G.A., Paerl, H.W., Ibelings, B.W., Verspagen, J.M.H. y Visser, P.M., 2018. Cyanobacterial blooms. En: *Nature Reviews Microbiology*, 16(8), pp.471–483. DOI: 10.1038/s41579-018-0040-1
- IBGE, 2018. *Monitoramento da cobertura e uso da terra do Brasil 2014-2016* [En línea]. Río de Janeiro: IBGE. [Consulta: 10 de noviembre de 2020]. Disponible en: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101625.pdf>
- Illarze, M., 2015. *Embalses como incubadoras de cianobacterias: efecto de la residencia del agua y de la disponibilidad de nutrientes*. Montevideo: Facultad de Ciencias, Universidad de la República. (Tesis de Grado).
- Kruk, C., Martínez, A., Martínez de la Escalera, G., Trinchin, R., M., G., Segura, A.M., Piccini, C., Brena, B., Fabiano, G., Pirez, M., Gabito, L., Alcántara, I., Yannicelli, B., 2019.

- Floración excepcional de cianobacterias tóxicas en la costa de Uruguay, verano 2019. En: *INNOTEC*, 18, pp.36–68. DOI: <https://doi.org/10.26461/18.06>
- Maavara, T., Parsons, C.T., Ridenour, C., Stojanovic, S., Dürr, H.H., Powley, H.R. y Van Cappellen, P., 2015. Global phosphorus retention by river damming. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(51), pp.15603–15608. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1511797112>
- Moss, B., 2008. Water pollution by agriculture. En: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1491), pp.659–666. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2176>.
- Paerl, H.W., 2017. Controlling cyanobacterial harmful blooms in freshwater ecosystems. En: *Microbial Biotechnology*, 10(5), pp.1106–1110. DOI: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12725>
- Paerl, H.W. y Otten, T.G., 2013. Harmful Cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. En: *Microbial Ecology*, 65(4), pp.995–1010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0159-y>
- Palmer, M. y Ruhi, A., 2019. Linkages between flow regime, biota, and ecosystem processes: Implications for river restoration. En: *Science*, 365(6459). DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aaw2087>
- Patrone, J.C., 2014. *Hidroelectricidad – Uruguay. Informe Final*. [En línea]. Buenos Aires: Programa Marco para la Gestión Sostenible de los Recursos Hídricos de la Cuenca del Plata. [Consulta: 11 de noviembre de 2020]. Disponible en: [https://cicplata.org/wp-content/uploads/2019/08/Hidroelectricidad-Uruguay\\_Julio-Patrone.pdf](https://cicplata.org/wp-content/uploads/2019/08/Hidroelectricidad-Uruguay_Julio-Patrone.pdf)
- Pérez, M.C., Bonilla, S. y Martínez, G., 1999. Phytoplankton community of a polymictic reservoir, La Plata River basin, Uruguay. En: *Revista Brasileira de Biologia*, 59(4), pp.535–541. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0034-71081999000400002>
- Pérez, M. C., 2002. Fitoplancton del Río Negro, Uruguay. En: *Limnetica*, 21(1–2), pp.81–92.
- Ramankutty, N., Mehrabi, Z., Waha, K., Jarvis, L., Kremen, C., Herrero, M. y Rieseberg, L.H., 2018. Trends in global agricultural land use: implications for environmental health and food security. En: *Annual Review of Plant Biology*, 69(604), pp.789–815. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040256>
- Rangel, L.M., Silva, L.H.S., Rosa, P., Roland, F. y Huszar, V.L.M., 2012. Phytoplankton biomass is mainly controlled by hydrology and phosphorus concentrations in tropical hydroelectric reservoirs. En: *Hydrobiologia*, 693(1), pp.13–28. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1083-3>
- Reynolds, C.S., 2006. *Ecology of phytoplankton*. Cambridge: Cambridge University Press.

ISBN: 9780521605199.

Sinha, E., Michalak, A.M., Calvin, K.V. y Lawrence, P.J., 2019. Societal decisions about climate mitigation will have dramatic impacts on eutrophication in the 21st century. En: *Nature Communications*, 10(1), pp.939. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08884-w>

Steffensen, D.A., 2008. Economic cost of cyanobacterial blooms. En: *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. New York: Springer. pp.855-865. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-75865-7\\_37](https://doi.org/10.1007/978-0-387-75865-7_37)

Tundisi, J.G., Rocha, O., Matsumura-Tundisi, T. y Braga, B., 1998. Reservoir management in South America. En: *International Journal of Water Resources Development*, 14(2), pp.141-155. DOI: <https://doi.org/10.1080/07900629849367>

Uruguay. Ministerio de Medio Ambiente, 2020. *Observatorio ambiental nacional: calidad de agua* [En línea]. Montevideo: Ministerio de Ambiente. [Consulta: 08 de junio de 2021]. Disponible en: <https://www.dinama.gub.uy/oan/datos-abiertos/calidad-agua/>

Uruguay. Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, DINAMA, 2019a. Ref.: CUECAR S.A y BLANVIRA S.A. *Solicitud de Autorización Ambiental Previa para su proyecto Planta de celulosa y zona franca en el departamento de Durazno. Informe final*. [En línea]. Montevideo: DINAMA. [Consulta: 20 de abril de 2020]. Disponible en: <https://www.ambiente.gub.uy/oan/wp-content/uploads/2018/02/20190514-IF-UPM-FINAL.pdf>

Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, DINAMA, 2019b. *Red de Monitoreo Costero. Monitoreo de playas. Quinquenio 2013-2018 y temporada 2018-2019. Informe técnico* [En línea]. Montevideo: DINAMA. [Consulta: 9 de febrero de 2021]. Disponible en: [https://www.dinama.gub.uy/oan/documentos/Informe\\_monitoreo\\_calidad\\_de\\_playas\\_2018-2019.pdf](https://www.dinama.gub.uy/oan/documentos/Informe_monitoreo_calidad_de_playas_2018-2019.pdf)

Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, DINAMA, 2018. *Calidad ambiental de la cuenca del Río Negro 2009 - 2017* [En línea]. Montevideo: DINAMA. [Consulta: 20 de enero de 2021]. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ambiente/comunicacion/publicaciones/informe-calidad-ambiental-del-rio-negro-2009-2017>.

Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, DINAMA, 2012. *Monitoreo y evaluación de calidad de agua. Plan para la definición de una línea de base del Río Negro. Reporte de resultados del período. Informe de consultoría 14* [En línea]. Montevideo: DINAMA-PNUD. [Consulta: 12 de noviembre de 2020]. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ambiente/comunicacion/publicaciones/monitoreo-evaluacion-del-rio-negro-2011>.

Uruguay. Decreto 253/979, de 9 de mayo de 1979. *Diario Oficial*, 31 de mayo de 1979, p.1479.

Valderrama, J.C., 1981. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. En: *Marine Chemistry*, 10(2), pp.109–122. DOI: [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(81\)90027-X](https://doi.org/10.1016/0304-4203(81)90027-X)

van Apeldoorn, M.E.V., Egmond, H.P., Speijers, G.J.A. y Bakker, G.J.I., 2007. Toxins of cyanobacteria. En: *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(1), pp.7–60. DOI: <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600185>



## **Efecto de la radiación UV-C sobre la calidad y la flora fúngica contaminante natural de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L., variedad O'Neal)**

**Effect of UV-C radiation on the quality and contaminating fungal flora of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L., variety O'Neal)**

**Efeito da radiação UV-C na qualidade e contaminação da flora fúngica de mirtilos (*Vaccinium corymbosum* L., variedade O'Neal)**

**Laura Noemí Frisón**<sup>1</sup>, \* <https://orcid.org/0000-0002-5274-7224>

**María Zoé Rivas**<sup>1,2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-6817-9866>

**Carolina Andrea Chiericatti**<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2967-8515>

**Andrea Marcela Piagentini**<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-0717-5503>

\*Autor de contacto: [lfrison@fiq.unl.edu.ar](mailto:lfrison@fiq.unl.edu.ar)

<sup>1</sup>Cátedra de Microbiología, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.

<sup>2</sup>Instituto de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.

**Recepción:** 3 Diciembre 2020 **Aprobación:** 16 Abril 2021

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional.

**Resumen:** Se estudió el efecto de la radiación ultravioleta (UV-C,  $4 \text{ W m}^{-2}$ ) sobre la calidad y los mohos aislados de arándanos. Se modeló el efecto de la radiación UV-C (ensayos *in vitro*:  $4 \text{ W m}^{-2}$ , durante 20 minutos) sobre los conidios de cuatro de los mohos más frecuentes y abundantes aislados de arándanos (*Aspergillus niger*, *Arthrimum phaeospermum*, *Penicillium decumbens* y *Eurotium repens*). La reducción en los recuentos de los mohos se produjo hasta los 10 minutos de tratamiento. Se aplicó el tratamiento seleccionado sobre las muestras de arándanos inoculadas con los conidios de los dos mohos más resistentes (*Aspergillus niger* y *Arthrimum phaeospermum*). La radiación UV-C (dosis =  $2,4 \text{ kJ m}^{-2}$ , 10 minutos) incrementó ligeramente el valor de pH sin modificar significativamente el contenido de los sólidos solubles, la firmeza y el color de los arándanos. El tratamiento con UV-C incrementó el contenido de fenoles totales (13%) y la capacidad antioxidante (8%) con respecto a los arándanos sin tratar. Es fundamental identificar la microflora contaminante para aplicar correctamente el tratamiento. La dosis de UV-C seleccionada mantuvo los atributos relacionados con la calidad sensorial, aumentando el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de los arándanos.

**Palabras clave:** mohos, antifúngico, ultravioleta.

**Abstract:** The effect of UV-C radiation (in vitro tests:  $4 \text{ W m}^{-2}$ , for 20 min) on the conidia of the four more frequent and abundant molds isolated from blueberry (*Aspergillus niger*, *Arthrimum phaeospermum*, *Penicillium decumbens*, and *Eurotium repens*) was modeled. The reduction in mold counts occurred up to 10 minutes of treatment. The selected treatment was applied to the blueberry samples inoculated with the conidia of the two most resistant molds (in vivo tests: *Aspergillus niger* and *Arthrimum phaeospermum*). UV-C radiation ( $2,4 \text{ kJ m}^{-2}$ , 10 minutes) slightly increased the pH value without significantly modifying the soluble solids content, firmness, and color of blueberries. Treatment with UV-C increased the concentration of total phenols (13%) and the antioxidant capacity of blueberries (8%) compared to the untreated sample. It is essential to identify the contaminating microflora to correctly apply the treatment. The UV-C selected dose maintained the attributes related to sensory quality, increasing the content of phenolic compounds, and the antioxidant capacity of blueberries.

**Keywords:** molds, antifungal, ultraviolet.

**Resumo:** O efeito da radiação UV-C (testes *in vitro*:  $4 \text{ W m}^{-2}$ , por 20 minutos) sobre os conidios dos quatro fungos mais frequentes e abundantes isolados de mirtilo (*Aspergillus niger*, *Arthrimum phaeospermum*, *Penicillium decumbens* e *Eurotium repens*) foi modelado. A redução na contagem de fungos ocorreu até 10 minutos depois do tratamento. O tratamento selecionado foi aplicado às amostras de mirtilo inoculadas com os conídios dos dois fungos mais resistentes (testes *in vivo*: *Aspergillus niger* e *Arthrimum phaeospermum*). A radiação UV-C ( $2,4 \text{ kJ m}^{-2}$ , 10 minutos) aumentou ligeiramente o valor do pH sem modificar significativamente o conteúdo de sólidos

solúveis, firmeza e cor dos mirtilos. O tratamento com UV-C aumentou a concentración de fenóis totais (13%) e a capacidade antioxidante dos mirtilos (8%) en comparación com a amostra non tratada. É fundamental identificar a microbiota contaminante para aplicar correctamente o tratamento. A dose de UV-C seleccionada manteve os atributos relacionados con a calidade sensorial, aumentando o teor de compostos fenólicos, e a capacidade antioxidante dos mirtilos.

**Palabras-chave:** bolores, antifúngico, ultravioleta.

## INTRODUCCIÓN

Hay un notable cambio en las pautas de consumo hacia productos naturales con componentes benéficos para la salud. En este sentido, el consumo de frutas y hortalizas frescas es parte importante de una dieta saludable. Aporta vitaminas, minerales, fibras y compuestos biológicamente activos, responsables de su potencial saludable (Cano, et al., 2005; Rodríguez-Arzuaga y Piagentini, 2018). Los arándanos (*Vaccinium corymbosum*), en particular, tienen un impacto altamente positivo sobre la salud debido a su concentración de compuestos fenólicos con gran capacidad antioxidante, responsables también del color rojo-azulado característico de su piel. Dietas ricas en antioxidantes están asociadas con un menor riesgo de padecer patologías cardiovasculares, neurodegenerativas, cáncer e incluso el envejecimiento, todas ellas vinculadas al estrés oxidativo (López Alarcón y Denicola, 2013). Esto ha causado un aumento generalizado en el consumo de arándanos, por ser reconocido como un alimento saludable debido a su elevado valor nutricional y terapéutico (Azevedo, et al., 2010; Rivadeneira y Kirschbaum, 2011).

El arándano es una fruta muy perecedera, en general su vida útil no supera las dos o tres semanas dependiendo de la variedad, cultivo, cosecha y el posterior proceso hasta su consumo (Rivadeneira y Kirschbaum, 2011). Las enfermedades fúngicas junto a la mosca de la fruta son las principales causas de pérdidas de calidad (Munitz, et al., 2013; Rivas, et al., 2019). La mayoría de los propágulos fúngicos pueden dispersarse rápidamente por el agua y por el aire, y sobrevivir en condiciones extremas (Snyder y Worobo, 2018), pero muestran una resistencia limitada a los tratamientos térmicos. Sin embargo, los mohos resistentes al calor (que presentan ascosporas) pueden sobrevivir a procesos térmicos, causando deterioro a productos elaborados a base de frutas (Slongo y Aragão, 2006; Frisón, et al., 2012).

Se ha estudiado la aplicación de nuevas tecnologías de procesamientos no térmicos de alimentos, teniendo en cuenta que la utilización de técnicas tradicionales puede afectar las características sensoriales y el valor nutricional de las frutas. Se plantea entonces mejorar las técnicas de descontaminación tradicionales y/o encontrar nuevas tecnologías que las superen en eficiencia (Rodríguez-Arzuaga y Piagentini 2018; Van de Velde, et al., 2013). Estas tecnologías utilizan diferentes métodos químicos y/o

físicos, y procesos no térmicos como el uso de la radiación ultravioleta (radiación UV-C), con el objetivo de asegurar la inocuidad, minimizar pérdidas de compuestos bioactivos, añadir valor, y producir cambios mínimos en la calidad sensorial (Cano, et al., 2005; Gutiérrez, et al., 2016).

El efecto germicida de la radiación UV-C ha sido probado en distintos alimentos como un método superficial de descontaminación, que tiene la ventaja de no dejar residuos ni incrementar la temperatura. Por esta razón, se considera una buena alternativa en el manejo postcosecha de frutas y hortalizas frescas ya que es una tecnología de fácil aplicación y bajo costo, que reduce la carga microbiana inicial en la superficie del producto e induce la resistencia del huésped a los microorganismos. (Gallardo Sandoval, 2013, Guerrero-Beltrán y Barbosa-Cánovas, 2004). Además de su empleo para detener el deterioro ocasionado por el crecimiento de microorganismos, la radiación UV-C ha sido evaluada como tratamiento para retardar el avance de los procesos de senescencia (ablandamiento, cambios de color, etcétera) en productos como tomate, hojas de lechuga y espinaca, cítricos, duraznos, zanahorias, manzanas, uvas y frutillas (Tardón, et al., 2011).

Por otro lado, las dosis bajas de la radiación UV-C pueden desencadenar algunas reacciones favorables en frutas y hortalizas, que pueden conducir al incremento de los componentes beneficiosos para la salud (Ribeiro, et al., 2012).

Existen diversas variables que afectan el tratamiento con radiación UV-C, entre las cuales se pueden considerar el tiempo de exposición, la intensidad de la fuente, la composición del alimento y el diseño del equipo, entre otras. Por ello resulta relevante la evaluación de esta tecnología en cada producto en particular, y así poder definir las condiciones óptimas de aplicación y los posibles cambios en calidad (Kowalski, 2009).

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo de este trabajo fue estudiar y modelar la acción de diferentes dosis de radiación UV-C para la reducción y/o eliminación de los mohos aislados de arándanos frescos (*Vaccinium corymbosum* L. O'Neal) y tratados térmicamente (mohos termorresistentes), así como también determinar el efecto de la aplicación de este tratamiento sobre la calidad y el potencial saludable de los arándanos frescos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Muestras de arándanos y equipo de radiación UV-C**

Se estudiaron arándanos azules frescos (*Vaccinium corymbosum* L., variedad O'Neal), sin daño fisiológico aparente, con un diámetro de  $1,32 \pm 0,14$  cm y un peso individual de  $1,35 \pm 0,39$  g. El estudio se realizó con arándanos provenientes de una plantación comercial de la zona de Concordia, provincia de Entre Ríos, Argentina. Los mismos

fueron cosechados manualmente y transportados inmediatamente hasta el laboratorio a 1,5 °C. Se utilizó un equipo de radiación UV-C diseñado por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ingeniería Química (U.N.L.), construido en acrílico, y que posee dos lámparas de luz ultravioleta (Philips G30 T8, 15 W,  $\lambda$ : 254 nm) cada una ubicada en forma paralela y separadas a una distancia de 5 cm entre ambas, como se observa en la Figura 1.



**Figura 1.** Equipo de radiación UV-C utilizado

### **Efecto de la radiación UV-C sobre mohos aislados de arándanos (ensayo *in vitro*)**

Se estudió el efecto del tratamiento con radiación UV-C sobre los conidios de mohos aislados, identificados, y conservados de arándanos frescos (STT) y tratados térmicamente 10 min a 80°C (CTT), que presentaron mayor frecuencia (Fr) y abundancia (Ab) de aparición en un estudio realizado sobre los mismos lotes de frutas (Rivas, et al., 2019). Los mohos aislados e identificados de arándanos STT utilizados fueron *Aspergillus niger* (31% Ab y 70% Fr) y *Penicillium decumbens* (11% Ab y 21% Fr). Los mohos aislados e identificados de arándanos CTT utilizados fueron *Arthrinium phaeospermum* (36% Ab y 30% Fr) y *Eurotium repens* (21% Ab y 13% Fr). Las cepas puras de cada moho conservadas en crioviales con Agar – Agua al 0.2% ( $m v^{-1}$ ) se reactivaron a través de repiques sobre placas con medio Agar Extracto de malta (MEA) simple concentración con agregado de cloranfenicol. Las placas se incubaron por 7 días a 28°C

para tener cultivos en fase exponencial de crecimiento y con suficientes conidios para realizar los tratamientos con radiación UV-C.

Se cosecharon los propágulos fúngicos (conidios y restos de hifas) de cada una de las especies por raspado de la superficie de las placas de reactivación y se resuspendieron en una solución de Tween<sup>®</sup>20 (polysorbate) (0,1% vv<sup>-1</sup>). Las concentraciones iniciales de las suspensiones se determinaron por recuento en cámara de Neubauer y se ajustó la concentración a un valor de 10<sup>5</sup> - 10<sup>6</sup> propágulos mL<sup>-1</sup>. Las concentraciones iniciales (N<sub>0</sub>) se corroboraron por recuento microbiológico, cultivando en placas en medio MEA e incubando por 7 días a 28°C (Sobrero, et al., 2013). De manera similar, se obtuvieron los recuentos (N) luego de realizado cada tratamiento con radiación UV-C.

Para evaluar la acción de diferentes dosis de radiación UV-C sobre los propágulos fúngicos, se realizaron ensayos a una intensidad constante (I= 4 W m<sup>-2</sup>) y diferentes tiempos de exposición (0; 5; 10 y 20 min) o dosis (D= 0; 1,2; 2,4; y 4,8 kJ m<sup>-2</sup>). Se colocó 1 mL de suspensión de concentración conocida de cada propágulo fúngico sobre una placa de vidrio estéril y se sometió a la acción de la radiación UV-C a diferentes tiempos de exposición. Cada ensayo se realizó por triplicado y para cada especie estudiada.

Se determinaron las reducciones decimales entre los recuentos iniciales (N<sub>0</sub>) y finales (N) después de cada tratamiento, la sensibilidad al tratamiento de los diferentes mohos estudiados y el rango efectivo de tiempo para realizar las experiencias sobre arándanos frescos inoculados.

### Modelado de la inactivación de los mohos aislados

Los datos cinéticos de inactivación de los ensayos con radiación UV-C se ajustaron a un modelo bifásico de inactivación (Cerf, 1977) con el programa GinaFIT (Geeraerd, et al., 2005). La relación entre la supervivencia y el tiempo de exposición está dada por la Ecuación 1:

$$\frac{N}{N_0} = f \cdot e^{-k_1 \cdot t} + (1-f) e^{-k_2 \cdot t} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde  $N$  es el número de sobrevivientes (células mL<sup>-1</sup>),  $N_0$  es la población inicial (células mL<sup>-1</sup>),  $f$  es una constante que indica la transición de la primera fase a la segunda,  $k_1$  y  $k_2$  son las constantes de inactivación para las dos fases (min<sup>-1</sup>) y  $t$  es el tiempo de exposición (min).

Los valores del tiempo de reducción decimal (D<sub>i</sub>), que expresan el tiempo de exposición requerido para una reducción de los recuentos de células en un 90% del valor inicial, son estimados para la primera y la segunda fase por  $D_1 = \ln 10 k_1^{-1}$  y  $D_2 =$

$\ln 10 k_2^{-1}$ , respectivamente. La supervivencia a la transición de la primera a la segunda fase de inactivación se estimó por  $N_{Tr} N_0^{-1} = 1 - f$ .

### **Aplicación de radiación UV-C a arándanos frescos (ensayos *in vivo*)**

Bajo las condiciones determinadas en los ensayos *in vitro*, se estudió el efecto de la radiación UV-C sobre los arándanos frescos inoculados (con los mohos que resultaron más resistentes de acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*) y sin inocular. Se hicieron los recuentos microbiológicos en los arándanos inoculados antes y después de la realización de cada experiencia y se determinaron los atributos de calidad sobre los arándanos sin inocular. Se colocaron 0,5 mL de suspensión de propágulos fúngicos de concentración conocida sobre arándanos frescos (Sobrero, et al., 2013), se dejaron secar durante 3 h sobre placa de vidrio estéril en corriente de aire estéril provisto por un flujo laminar. Luego, se sometieron a la acción de la radiación UV-C en la dosis determinada en el ensayo *in vitro*. Los arándanos se sumergieron en 90 mL de agua de peptona al 0,1 %  $mv^{-1}$  contenida en bolsas estériles, se homogeneizaron manualmente y se realizó el recuento microbiológico realizando diluciones sucesivas en agua de peptona 0,1%  $mv^{-1}$  y sembrando 1 mL de la suspensión en medio MEA e incubando por 7 días a 28°C. Los resultados se expresaron como UFC  $mL^{-1}$ .

### **Atributos de calidad de arándanos frescos**

Antes y después del tratamiento con radiación UV-C se determinaron los siguientes atributos de calidad: pH, contenido de sólidos solubles, firmeza, parámetros instrumentales de color, fenoles totales, antocianinas totales, y capacidad antioxidante.

### **Determinación de pH y del contenido de sólidos solubles**

La determinación de pH se realizó por triplicado para cada muestra, utilizando un pHmetro compacto Twin pH Horiba B-213 (Horiba Ltd, Kyoto, Japón). Para la determinación del contenido de sólidos solubles se utilizó un refractómetro portátil digital Pocket ATAGO PAL-ALFA (ATAGO CO., LTD, Tokyo, Japón). Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron en °Brix.

### **Determinación de la firmeza**

Se determinó la firmeza mediante ensayos de penetración con un analizador de textura TA XT Plus Stable Micro Systems (Godalming, Surrey, Reino Unido), equipado con una celda de carga de 50 N y con una punta cilíndrica de acero inoxidable de 4 mm de diámetro, con una distancia y velocidad de penetración de 10 mm y de 1  $mms^{-1}$ , respectivamente. La fuerza máxima determinada ( $F_m$ ) corresponde al punto de ruptura del epicarpio (límite de elasticidad) y representa la firmeza, [N]. Se realizaron

15-20 determinaciones por muestra.

### **Determinación de parámetros instrumentales de color**

La evaluación instrumental del color se realizó utilizando un espectrofotómetro Minolta CM 508-d (Konica Minolta Inc., Ramsey, NJ, EEUU), con iluminante D65, ángulo del observador 10°, y componente especular excluido. Se evaluaron los parámetros CIELab y sus índices derivados: ángulo de tono ( $h_{ab}$ ) y croma ( $C_{ab}^*$ ) de acuerdo con Piagentini y Pirovani (2017). Se realizaron 15-20 medidas por cada muestra.

### **Determinación de fenoles totales, antocianinas totales y capacidad antioxidante**

#### **Preparación del extracto**

Se pesaron 5 g de cada muestra de arándanos, previamente triturados y homogeneizados. Se agregaron 75 mL de una solución extractante de acetona/agua (80/20), y se sonicaron durante 15 min (baño con ultrasonido marca TESTLAB modelo TB04TDCCD, Buenos Aires). Posteriormente, se centrifugó a 12000 g a 4°C durante 15 min en centrífuga marca Heal Force modelo Neofuge 18R (Hong Kong, China). Se separó el sobrenadante y se lo utilizó para la determinación de fenoles totales, antocianinas totales y capacidad antioxidante de las muestras de arándano.

#### **Contenido de fenoles totales**

La determinación del contenido de fenoles totales se llevó a cabo a través del método de Folin-Ciocalteu, de acuerdo con Rodríguez-Arzuaga y otros (2016). Se determinó su concentración midiendo la absorbancia a 760 nm (espectrofotómetro Thermo Scientific modelo Genesys 10S UV-Vis). Los resultados fueron expresados en miligramos de ácido gálico equivalente (AGE) por 100 g (mg AGE/100 g).

#### **Antocianinas totales**

1. La determinación de la concentración de antocianinas monoméricas totales se llevó a cabo a través del método de pH - diferencial (Giusti y Wrolstad, 2001). Se midió la absorbancia de los extractos a 510 y 700 nm a pH 1 y 4,5. Las absorbancias se convirtieron a mg de cianidina-3-glucósido/100 g (mg C3G/100 g arándanos), con un coeficiente de extinción molar de 26900 L/(mol cm), un camino óptico de 1 cm y una absorbancia ( $A$ ), de acuerdo con la Ecuación 2:

$$A = [(A_{510} - A_{700})_{pH=1} - (A_{510} - A_{700})_{pH=4,5}] \quad (\text{Ecuación 2})$$

### Capacidad antioxidante

Se cuantificó por la disminución de la absorbancia de una solución metanólica de DPPH\* (30 mg/L) a 517 nm en presencia del extracto, después de 120 min de reacción. Se expresó como capacidad antioxidante equivalente al ácido ascórbico (AEAC), de acuerdo con Rodríguez-Arzuaga y Piagentini (2018). Ecuación 3:

$$AEAC \left( \frac{mgAA}{100g} \right) = \frac{IC_{50}(AA)}{IC_{50} (muestra)} \cdot 10^5 \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde  $IC_{50}$  de AA e  $IC_{50}$  (muestra) son la cantidad de AA (Ácido Ascórbico) o peso fresco de la muestra, respectivamente, en 1 ml de reacción, necesaria para reducir al 50% la concentración inicial de DPPH\*, obtenida de la gráfica de DPPH\* remanente (%) vs concentración ( $mg mL^{-1}$ ).

### Análisis estadístico

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) y el test de diferencias de medias de Duncan para evaluar el efecto del tratamiento sobre todos los parámetros evaluados. Se utilizó el programa estadístico Statgraphics Centurion XV (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, Virginia, EEUU). El ajuste de los datos experimentales de recuentos de mohos a los modelos cinéticos propuestos se realizó con el programa GInaFiT (Geeraerd, et al., 2005).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Cinética de inactivación de los mohos aislados de arándanos por aplicación de radiación UV-C (ensayo *in vitro*)

Se obtuvieron reducciones en el rango de 1,2 a 3,6 log, dependiendo de la especie de moho estudiada y del tiempo de aplicación de la radiación UV-C (Tabla 1). Para el caso de *Aspergillus niger*, *Arthrinium phaeospermum* y *Penicillium decumbens*, la reducción no presenta diferencias significativas para tiempos mayores a 10 minutos (dosis  $\geq 2,4 \text{ kJ m}^{-2}$ ); mientras que para *Eurotium repens*, las reducciones se mantuvieron constantes a partir de los 5 minutos de tratamiento (dosis  $\geq 1,2 \text{ kJ m}^{-2}$ ).

**Tabla 1.** Efecto del tratamiento con radiación UV-C sobre los mohos aislados de arándanos.

| Tiempo (min)  | Reducción (log N <sub>0</sub> /N) |                          |                        |                              |
|---|-----------------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------------|
|   | <i>Arthriniun phaeospermun</i>    | <i>Aspergillus niger</i> | <i>Eurotium repens</i> | <i>Penicillium decumbens</i> |
| 0   | (0,00 ± 0,33) a                   | (0,00 ± 0,18) a          | (0,00 ± 0,34) a        | (0,00 ± 0,07) a              |
| 5   | (1,27 ± 0,19) b                   | (1,57 ± 0,10) b          | (1,91 ± 0,20) b        | (2,11 ± 0,04) b              |
| 10  | (1,92 ± 0,19) c                   | (2,31 ± 0,10) c          | (2,30 ± 0,20) b        | (3,63 ± 0,07) c              |
| 20  | (1,77 ± 0,30) c                   | (2,71 ± 0,16) c          | (2,65 ± 0,31) b        | (3,63 ± 0,07) c              |
| Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por el test de Duncan (p<0,05) |                                   |                          |                        |                              |

Los datos experimentales obtenidos se ajustaron al modelo bifásico de inactivación. Los valores de la raíz del error cuadrado medio (RMSE) se encontraron en los rangos adecuados, indicando que el modelo bifásico era el adecuado para representar los datos experimentales (Geeraerd, et al., 2005). Este modelo permitió la estimación de los valores de tiempo de reducción decimal D<sub>1</sub> (para la primera fase de inactivación) y D<sub>2</sub> (para la segunda fase) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Parámetros del modelo bifásico para la cinética de inactivación con radiación UV-C.

| Parámetros   | Mohos                          |                          |                        |                              |
|--|--------------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------------|
|  | <i>Arthriniun phaeospermun</i> | <i>Aspergillus niger</i> | <i>Eurotium repens</i> | <i>Penicillium decumbens</i> |
| f  | 0,9865 ± 0,032                 | 0,9948 ± ,00229          | 0,9888 ± ,00112        | 0,9998 ± 0,00002             |
| k <sub>1</sub> (min <sup>-1</sup> )  | 0,66 ± 0,30                    | 0,73 ± 0,07              | 1,07 ± 0,04            | 1,48 ± 0,03                  |
| k <sub>2</sub> (min <sup>-1</sup> )  | 0,00 ± 0,09                    | 0,04 ± 0,02              | 0,08 ± 0,01            | 0,00 ± 0,01                  |
| Log(N <sub>0</sub> )   | 5,16 ± 0,26                    | 5,88 ± 0,10              | 6,65 ± 0,12            | 5,61 ± 0,05                  |
| D <sub>1</sub> (min)   | 3,489                          | 3,15                     | 2,15                   | 1,56                         |
| D <sub>2</sub> (min)   | -                              | 57,56                    | 28,78                  | -                            |
| RMSE   | 0,2319                         | 0,1153                   | 0,0434                 | 0,0614                       |
| R <sup>2</sup>   | 0,9182                         | 0,9890                   | 0,9984                 | 0,9985                       |
| N <sub>0</sub> : población inicial (células mL <sup>-1</sup> ), f: constante que indica la transición de la primera fase a la segunda, k <sub>1</sub> y k <sub>2</sub> : constantes de inactivación para las dos fases, RMSE: error cuadrado medio, D <sub>i</sub> : Tiempo de reducción decimal (min). R <sup>2</sup> : Coeficiente de determinación. |                                |                          |                        |                              |

Se pudo observar que el tratamiento con radiación UV-C permitió reducir en 2 o más órdenes logarítmicos los recuentos de los mohos aislados de arándanos para una dosis máxima de  $4,8 \text{ kJ m}^{-2}$ . *Penicillium decumbens* fue el más sensible a este tratamiento entre los mohos ensayados, presentando la mayor reducción luego de 20 min (3,63 log) y el menor tiempo de reducción decimal ( $D_1$ : 1,56 min). Por otra parte, *Arthrimum phaeospermum* fue el menos sensible al tratamiento realizado con radiación UV-C, presentando la menor reducción luego de 20 min (1,77 min), y el mayor tiempo de reducción decimal ( $D_1$ : 3,49 min) (Tablas 1 y 2). Estos resultados coinciden con lo informado por Millán Villarroel y otros (2015), que indican que la efectividad germicida de la radiación UV-C puede variar entre especies de microorganismos. Se ha demostrado, además, que puede mejorar la actividad de algunas enzimas, inhibir el crecimiento microbiológico e inducir la expresión genética de resistencia a enfermedades, retrasando así la senescencia de las frutas y hortalizas frescas. Se ha reportado que cuando los microorganismos fitopatógenos invaden el tejido vegetal, la actividad de la enzima PAL del metabolismo secundario, la síntesis de lignina y la resistencia a la oxidación se regulan para resistir a los fitopatógenos (Xu, et al., 2016).

Otros autores reportaron que el tratamiento con radiación UV-C a dosis entre  $0,2$  y  $4,2 \text{ kJ m}^{-2}$ , como las usadas en este trabajo, reduce el deterioro microbiológico en frutas, afectando el metabolismo fúngico. Mendoza Alván (2014) obtuvo reducciones del 15 y del 20% en los recuentos iniciales de mohos totales en arándanos luego de tratarlos con radiación UV-C usando intensidades de 2 y  $4 \text{ kJ m}^{-2}$ , respectivamente. Ortiz Araque y otros (2018) informaron que dosis de  $4 \text{ kJ m}^{-2}$  de radiación UV-C redujeron la velocidad de germinación de los conidios de *Botrytis* y *Rhizopus* en frutillas.

### **Efecto de la radiación UV-C sobre los mohos inoculados en arándanos (ensayo *in vivo*)**

Para analizar el efecto del tratamiento sobre los mohos inoculados en arándanos frescos, se seleccionaron dos de los mohos más resistentes al tratamiento con UV-C de los cuatro estudiados: *Arthrimum phaeospermum* (moho termo-resistente, aislado de arándanos tratados térmicamente) y *Aspergillus niger* (aislado de arándanos frescos). Ambos mohos son los que presentaron las menores constantes de velocidad de inactivación ( $k_1$ ), y por lo tanto los mayores tiempos de reducción decimal ( $D_1$ ) (Tabla 2).

Las condiciones para la realización del tratamiento se seleccionaron a partir de los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, aplicando una dosis de  $2,4 \text{ kJ m}^{-2}$  (I:  $4 \text{ W m}^{-2}$ , t: 10 min), debido a que a dosis (o tiempos) superiores no se obtuvieron mayores reducciones (Tabla 1).

Se pudo observar que el tratamiento aplicado sobre *Aspergillus niger* y *Arthrimum pheospermum* (ensayo *in vivo*) presentó una mayor reducción (1,9 log y 2,3 log, respectivamente) con relación al tratamiento aplicado sobre arándanos inoculados (ensayo *in vivo*) (1,3 log y 1 log, respectivamente).

Perkins-Veazie y otros (2008) estudiaron el efecto de la radiación UV-C en arándanos frescos entre 1, 2 y 4 kJ m<sup>-2</sup>, determinando que la dosis con mayor efectividad fue la de 2 kJ m<sup>-2</sup> puesto que logra reducir eficazmente el *Colletotrichum acutatum*, syn. *C. gloeosporioides*, causante de antracnosis. Sin embargo, en otros productos se necesitaron dosis superiores. Es así, que una dosis entre 10 kJ m<sup>-2</sup> y 12,5 kJ m<sup>-2</sup> de radiación UV-C redujo los recuentos de mohos, levaduras y bacterias en carambolas frescas cortadas, y produjo una ligera reducción sobre pimiento fresco cortado (Moreno, et al., 2017; Rodoni, et al., 2015). Por su parte, De La Cruz Rea (2011) determinó que la aplicación de la radiación UV-C en dosis de 8; 12,5 y 16 kJ m<sup>-2</sup> retrasó el desarrollo del crecimiento de mohos, levaduras y aerobios mesófilos totales, considerando a la radiación UV-C como una alternativa para controlar los microorganismos en mortiño (*Vaccinium floribundum*).

La reducción de la efectividad de la radiación UV-C sobre los mohos inoculados en arándano (ensayo *in vivo*), podría deberse a la forma y al tipo de cubierta del fruto, y a la superficie que es irradiada. La composición del producto irradiado también influye de forma muy importante en la eficacia del tratamiento (Syamaladevi, et al., 2012).

La inactivación de mohos por la radiación UV-C es dependiente de la matriz en la que se encuentran. Las frutas que presentan una superficie plana y lisa están generalmente asociadas a una mayor eficiencia de inactivación al ser tratadas con radiación UV-C. En cambio, para aquellas frutas con intensa rugosidad en su superficie, como es el caso de la piña, se espera que por el efecto sombra no se logren inactivar ciertas células microbianas, afectando así el efecto germicida (Yaun, et al., 2004). El tratamiento resulta inefectivo sobre superficies con poca área superficial expuesta y/o porosas (Guerrero-Beltrán y Barbosa-Cánovas, 2004). Este tipo de tratamiento requiere que toda la superficie del objeto quede expuesta a la radiación UV-C durante un tiempo suficiente para que cualquier microorganismo presente pueda acumular la dosis letal, ya que la eficacia de la radiación UV-C depende de la estructura de la superficie o topografía, presentando su limitación debido al efecto sombra (Kowalski, 2009).

El tiempo de exposición a la radiación UV-C dependerá no solo de la dosis que se desea alcanzar, sino de la capacidad del fruto para resistir a este tratamiento. Se debe tener en cuenta el tipo de tejido vegetal expuesto (si posee una cutícula gruesa, una capa de cera protectora, una superficie lisa o rugosa, entre otras) (Kowalski, 2009).

## Efecto de la radiación UV-C sobre los atributos de calidad de arándanos

La respuesta de las frutas y hortalizas a la radiación UV-C depende en gran medida de la dosis, la forma de aplicación y del producto. La aplicación de tratamientos postcosecha para el control de mohos en arándanos puede afectar tanto los atributos de calidad como su potencial saludable. Por ello resulta relevante la evaluación de esta tecnología en cada producto en particular, y así poder definir las condiciones óptimas de aplicación.

Las muestras de arándanos tratadas con radiación UV-C (I: 4 W m<sup>-2</sup>; D: 2,4 kJ m<sup>-2</sup>; 10 min) presentaron valores de pH ligeramente más altos que la materia prima (MP), mientras que el contenido de sólidos solubles no se modificó significativamente ( $p < 0,05$ ) por efecto del tratamiento aplicado (Tabla 3).

**Tabla 3.** Efecto del tratamiento con radiación UV-C sobre pH, contenido de sólidos solubles, firmeza (Fm) y parámetros de color de arándanos.

| Muestra | pH     | Sólidos Solubles (°Brix) | Fm (N) | L*      | b*      | C*ab   |
|---------|--------|--------------------------|--------|---------|---------|--------|
| MP      | 2,91 a | 12,03 a                  | 4,12 a | 30,91 a | -3,23 a | 3,41 a |
| UV-C    | 3,09 b | 11,97 a                  | 4,23 a | 31,58 a | -3,19 a | 3,42 a |

Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos

Mendoza Alván (2014) determinó que los arándanos tratados con radiación UV-C a 2 kJ m<sup>-2</sup> redujeron el contenido de sólidos solubles con relación a la materia prima, a diferencia de lo determinado en este trabajo.

Las muestras tratadas con radiación UV-C presentaron un color similar a la materia prima (MP) (Tabla 3). Inmediatamente después de la aplicación del tratamiento, tanto la luminosidad (L\*) como el parámetro b\* ( $b^* < 0$ , representa el tono azul) y la cromaticidad (C\*ab) de los arándanos tratados presentaron valores similares a la materia prima, al igual que los parámetros a\* y h<sub>ab</sub> (no informados). Rodoni y otros (2015) no encontraron diferencias en la luminosidad y el tono (L\* y h<sub>ab</sub>) de pimientos frescos cortados por efecto de la radiación UV-C. Ortiz Araque y otros (2018) tampoco encontraron diferencias en el tono de las frutillas antes y después del tratamiento con radiación UV-C, pero sí una reducción en L\*.

Con respecto al efecto sobre la firmeza, se determinó que no existen diferencias significativas con respecto a la materia prima (Tabla 3). Resultados similares se informaron para pimiento fresco cortado y frutilla (Rodoni, et al., 2015; Ortiz Araque,

et al., 2018). Sin embargo, Mendoza Alván (2014) reportó que arándanos tratados con radiación UV-C en dosis de 2 kJ m<sup>-2</sup> presentaron una mayor firmeza que el control. Existen estudios que informan que frutas como el durazno, el tomate y la frutilla, tratadas con radiación UV-C, mejoran la retención de firmeza. El retraso del ablandamiento por acción de la radiación UV-C ha sido ampliamente relacionado con la inhibición de enzimas involucradas en el desmontaje de la pared celular (Andrade-Cuvi, et al., 2017).

El arándano MP presentó una concentración de compuestos fenólicos de 280,6 mg 100g<sup>-1</sup> (Tabla 4), que se encuentra en el rango determinado por Vázquez Castilla y otros (2012) para la misma fruta (158 a 459 mg 100g<sup>-1</sup>). En cuanto al efecto de la radiación UV-C, se determinó que la concentración de fenoles totales aumentó un 15,26% en relación con la materia prima (MP) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Contenido de fenoles totales, antocianinas totales y capacidad antioxidante (AEAC) de arándanos.

| <i>Muestra</i> | <i>Fenoles Totales</i><br>(mg AGE/100 g) | <i>Antocianinas Totales</i><br>(mg C3G/100 g) | <i>AEAC</i><br>(mg AA/100 g) |
|----------------|--|---|------------------------------|
| <b>MP</b>      | 280,57 a                                 | 92,52 b                                       | 321,12 a                     |
| <b>UV-C</b>    | 323,39 b                                 | 84,73 a                                       | 349,64 ab                    |

Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05) entre tratamientos, determinado por el Test de Duncan.

Estos resultados coinciden con el incremento reportado en el contenido de compuestos fenólicos luego de la aplicación de radiación UV-C de uvilla y mortiño, y el aumento en el contenido de flavonoides y fenoles totales en carambola (Andrade-Cuvi, et al., 2010, 2017).

Sin embargo, la radiación UV-C no produjo cambios en el contenido de fenoles totales en pimiento fresco cortado (Rodoni, et al., 2015). Algunos estudios han demostrado que los tratamientos con radiación UV-C pueden favorecer la acumulación de polifenoles con actividad antimicrobiana en las superficies de las frutas. Este incremento se explica a través de la inducción de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) (Ortiz Araque, et al., 2018). Las antocianinas son metabolitos secundarios de las plantas que otorgan color violeta y/o rojo, y su consumo tiene propiedades benéficas para el sistema inmune, es antiinflamatoria, y actúa como antioxidante y protector del sistema cardiovascular. Los arándanos contienen cinco de las seis antocianidinas que se encuentran en la naturaleza (cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina y malvidina) (Manganaris, et al., 2014).

En la Tabla 4 se puede observar que el tratamiento con radiación UV-C disminuyó en un 8,42% el contenido de antocianinas totales de los arándanos tratados con relación a MP.

Cote y otros (2013) informaron que luego del almacenamiento, las frutillas tratadas con radiación UV-C (D: 4 KJ m<sup>-2</sup>, I: 3 W m<sup>-2</sup>) presentaron un 25% más en el contenido de antocianinas que la muestra control.

Se ha observado que los arándanos, comparados con otras frutas, tienen una alta capacidad antioxidante debido a sus altas concentraciones de antocianinas y compuestos fenólicos (Jin, et al., 2011; Manganaris, et al., 2014). La actividad antioxidante de los distintos grupos de compuestos fenólicos presentes en el arándano es diferente. Sin embargo, se ha puesto de manifiesto que la actividad antioxidante se correlaciona mejor con el contenido fenólico total que con los distintos grupos de fenoles. No obstante, los efectos beneficiosos derivados de la actividad antioxidante de los distintos fenoles del arándano pueden ser distintos en función de la estructura química de cada compuesto (Kahkonen y Heinonen, 2003; Vázquez Castilla, et al., 2012).

En la Tabla 4 se puede observar que las muestras tratadas con irradiación UV-C aumentaron su capacidad antioxidante en un 8,88% con respecto a la muestra sin tratar (MP). Andrade-Cuvi y otros (2017) determinaron que la uvilla tratada con radiación UV-C (12,5 kJ m<sup>-2</sup>) presentó mayor capacidad antioxidante que el control, inmediatamente después del tratamiento. La naturaleza de la respuesta sugiere que la radiación UV-C provocó la acumulación de antioxidantes. Estos resultados coinciden además con Erkan y otros (2008), quienes determinaron que el uso de tratamientos con radiación UV-C en frutilla mejoró los mecanismos antioxidantes del fruto mediante el aumento de su actividad enzimática, contenido fenólico y disminución del deterioro en frutos tratados. Nuestros resultados coinciden además con Gallardo Sandoval (2013), quien observó que la aplicación de radiación UV-C en arándanos generaba un aumento en el contenido fenólico y en su poder antioxidante.

## CONCLUSIONES

En los ensayos de inactivación realizados sobre los cuatro mohos más frecuentes y abundantes aislados de arándanos frescos (*Aspergillus niger* y *Penicillium decumbens*) y tratados térmicamente (*Arthrimum phaeospermum* y *Eurotium repens*), se determinó que el tiempo de aplicación de la radiación UV-C (4 W m<sup>-2</sup>) afecta significativamente la reducción de los mohos, y que cada moho ensayado presenta una sensibilidad diferente al tratamiento. Se obtuvieron reducciones superiores al 99%, las cuales no se incrementaron significativamente para tiempos de tratamientos superiores a los diez minutos.

La cinética de inactivación de los mohos aislados de arándanos siguió el modelo bifásico en todos los casos. Se determinó que el moho más resistente a la radiación UV-C, de los cuatro estudiados, fue *Arthrimum phaeospermum*, presentando el mayor tiempo de reducción decimal (3,49 min).

En cuanto a los atributos fisicoquímicos relacionados con la calidad sensorial, el tratamiento aplicado con radiación UV-C (dosis = 2,4 kJ m<sup>-2</sup>) incrementó ligeramente el valor de pH sin modificar significativamente el contenido de sólidos solubles, la firmeza y el color de los arándanos.

En cuanto al contenido de compuestos bioactivos, el tratamiento con radiación UV-C incrementó el contenido de fenoles totales en 13%, y la capacidad antioxidante en 8% con respecto a los arándanos sin tratar.

Se puede concluir que es esencial identificar la flora contaminante para realizar la correcta selección de las condiciones de aplicación del tratamiento con radiación UV-C. La dosis aplicada (2,4 kJ m<sup>-2</sup>) mantuvo los atributos relacionados con la calidad sensorial, incrementando el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de los arándanos.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, a través del Proyecto PICT 2017-406.

## REFERENCIAS

- Andrade-Cuvi, M., Moreno, C., Henríquez, A., Gómez, A. y Concellón, A., 2010. Influencia de la radiación UV-C como tratamiento postcosecha sobre carambola (*Averrhoa carambola* L.) mínimamente procesada almacenada en refrigeración. En: *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 11 (1), pp.18-27. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81315093004>
- Andrade-Cuvi, M., Moreno, C., Zaro, M. y Concellón, A., 2017. Improvement of the Antioxidant Properties and Postharvest Life of Three Exotic Andean Fruits by UV-C Treatment. En: *Journal of Food Quality*, 2017 (Article 4278795), pp.10. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/4278795>
- Azevedo, J., Fernandes, I., Faria, A., Oliveira, J., Fernandes, A., Freitas, V. y Mateus, N., 2010. Antioxidant properties of anthocyanidins, anthocyanidin-3-glucosides and respective portisins. En: *Food Chemistry*, 119(2), pp.518-523. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.06.050>

- Cano, M., Sánchez-Moreno, C., de Pascual-Teresa, S. y de Ancos, B., 2005. Procesado mínimo y valor nutricional [En línea]. En: González-Aguilar, G.A., Gardea, A.A. y Cuamea-Navarro, F., eds. *Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados*. Capítulo 7. México. pp.155-176. [Consulta: 10 de setiembre de 2020]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/292813456\\_Procesado\\_minimo\\_y\\_valor\\_nutricional](https://www.researchgate.net/publication/292813456_Procesado_minimo_y_valor_nutricional)
- Cerf, O., 1977. Tailing of survival curves of bacterial spores. En: *Journal of Applied Bacteriology*, 42, pp.1-19. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1977.tb00665.x>
- Cote, S., Rodoni, L., Miceli, E., Concellón, A., Civello, P. y Vicente, A., 2013. Effect of radiation intensity on the outcome of postharvest UV-C treatments. En: *Postharvest Biology and Technology*, 83, pp.83-89. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.03.009>
- De La Cruz Rea, A., 2011. *Uso combinado de la radiación UV-C y almacenamiento refrigerado sobre el tiempo de vida útil del mortiño (Vaccinium floribundum)*. Quito: Facultad de Ciencias de la Ingeniería. Universidad Tecnológica Equinoccial. (Tesis de Grado). Disponible en: [http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/4937/1/47753\\_1.pdf](http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/4937/1/47753_1.pdf)
- Erkan, M., Wang, S. y Wang, C., 2008. Effect of UV treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme activity and decay in strawberry. En: *Postharvest Biology and Technology*, 48(2), pp.163-171. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.09.028>
- Frisón, L., Sobrero, S., De Jesús, J., Basílico, M. y Basílico, J., 2012. Identificación y caracterización de especies de *Neosartorya* aisladas de frutillas (*Fragarias* pp.) frescas y tratadas térmicamente [En línea]. En: *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(2), pp.319-329. [Consulta: 20 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://sites.google.com/site/1rvcta/v3-n2-2012/r10>
- Gallardo Sandoval, A., 2013. *Uso de luz UV-C en la calidad del arándano azul (Vaccinium ashei Reade)* [En línea]. México: Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, Montecillo, México. (Tesis de Maestría). [Consulta: 2 de setiembre de 2020]. Disponible en: <http://biblio.colpos.mx:8080/jspui/handle/10521/1911>

- Geeraerd, A., Valdramidis, V. y Van Impe, J., 2005. GIInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. En: *International Journal of Food Microbiology*, 102, pp.95-105. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.038>
- Giusti, M. y Wrolstad, R., 2001. Anthocyanins: characterization and measurement with uv-visible spectroscopy. (F1.2:1-13). En: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. DOI: <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00>
- Guerrero-Beltrán, J. y Barbosa-Cánovas, G., 2004. Advantages and limitations on processing foods by UV light. En: *Food Science and Technology International*, 10(3), pp.137-147. DOI: <https://doi.org/10.1177/1082013204044359>
- Gutiérrez, D., Ruiz Lopez, G., Sgroppo, S. y Rodríguez, S., 2016. Uso de la radiación UV-C en el proceso de elaboración de hortalizas de IV gama [En línea]. En: *Agrociencia*, 20(2), pp.7-13. [Consulta: 20 de agosto de 2020]. Disponible en: [http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?pid=S2301-15482016000200002&script=sci\\_abstract](http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?pid=S2301-15482016000200002&script=sci_abstract)
- Jin, P., Wang, S., Wang, C. y Zheng, Y., 2011. Effect of cultural system and storage temperature on antioxidant capacity and phenolic compounds in strawberries. En: *Food Chemistry*, 124(1), pp.262-270. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.029>
- Kahkonen, M. y Heinonen, I., 2003. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycones. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), pp.628-633. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf025551i>
- Kowalski, W., 2009. *Ultraviolet germicidal irradiation handbook*. Berlín: Springer-Verlag.
- López Alarcón, C. y Denicola, A., 2013. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and celular-based assay. En: *Analytica Chimica Acta*, 763(6), pp.1-10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051>
- Manganaris, G., Goulas, V., Vicente, A. y Terry, L., 2014. Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. En: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(5), pp.825-833. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.6432>

- Mendoza Alván, C., 2014. *Efecto de la dosis de irradiación UV-C y tiempo de almacenamiento a 1°C sobre las características fisicoquímicas, recuento de mohos y levaduras y aceptabilidad general de arándanos (Vaccinium corymbosum L.) cv. Biloxi* [En línea]. Trujillo: Universidad Privada Antenor Orrego. Facultad De Ciencias Agrarias. Escuela Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias. (Tesis de Grado). [Consulta: 27 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://cdn.blueberriesconsulting.com/2016/07/efectodeladosis.pdf>
- Millán Villarroel, D., Romero González, L., Brito, M. y Ramos-Villarroel, A., 2015. Luz ultravioleta: inactivación microbiana en frutas [En línea]. En: *SABER. Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*, Cumaná, Venezuela, 27(3), pp.454-469. [Consulta: 18 de setiembre de 2020]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=427743080011>
- Moreno, C., Cuvi, M., Zaro, M., Darré, M. y Concellón, A., 2017. Short UV-C treatment prevents browning and extends the shelf-life of fresh-cut varambola. En: *Journal of Food Quality*, pp.1-9. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/2548791>
- Munitz, M., Garrido, C., Gonzalez, H., Resnik, S., Medina Salas, P. y Montti, M., 2013. Mycoflora and potential mycotoxin production of freshly harvested blueberry in Concordia, Entre Ríos Province, Argentina. En: *International Journal of Fruit Science*, 13(3), pp.312-325. DOI: <https://doi.org/10.1080/15538362.2013.748374>
- Ortiz Araque, L., Rodoni, L., Darré, M., Ortiz, C., Civello, P. y Vicente, A., 2018. Cyclic low dose UV-C treatments retain strawberry fruit quality more effectively than conventional pre-storage single high fluence applications. En: *Food Science and Technology*, 92, pp.304-311. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.050>
- Perkins-Veazie, P., Collins, J. y Howard, L., 2008. Blueberry fruit response to postharvest application of ultraviolet radiation. En: *Postharvest Biology and Technology*, 47(3), pp.280-285. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.08.002>
- Piagentini, A. y Pirovani, M., 2017. Total phenolic content, antioxidant capacity, physicochemical attributes and browning susceptibility of different apple cultivars for minimal processing. En: *International Journal of Fruit Science*, 1(17), pp.102-116. DOI: <https://doi.org/10.1080/15538362.2016.1262304>
- Ribeiro, C., Canada, J. y Alvarenga, B., 2012. Prospects of UV radiation for application in postharvest technology. En: *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24(6), pp.586-597. DOI: <https://doi.org/10.9755/ejfa.v24i6.14677>

- Rivadeneira, M. y Kirschbaum, D., 2011. *INTA - Programa Nacional Frutales - Cadena arándano*. [s.l.]: INTA. [Consulta: 20 de febrero de 2018]. Disponible en: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-cadena\\_arandano.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-cadena_arandano.pdf)
- Rivas, M., Piagentini, A. y Frisón, L., 2019. Flora fúngica contaminante natural de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L. O'Neal) de arándanos frescos y tratados térmicamente. En: *Revista FAVE - Ciencias Agrarias*, 18(2). DOI: <https://doi.org/10.14409/fa.v19i2.8787>
- Rodoni, L., Zaro, M., Hasperué, J., Concellón, A. y Vicente, A., 2015. UV-C treatments extend the shelf life of fresh-cut peppers by delaying pectin solubilization and inducing local accumulation of phenolics. En: *Food Science and Technology*, 63(1), pp.408-414. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.042>
- Rodríguez-Azuaga, M. y Piagentini, A., 2018. New antioxidant treatment with yerba mate (*Ilex paraguariensis*) infusion for fresh-cut apples: modeling, optimization and acceptability. En: *Food Science and Technology International*, 24(3), pp.223-231. DOI: <https://doi.org/10.1177/1082013217744424>
- Rodríguez-Azuaga, M., Salsi, M. y Piagentini, A., 2016. Efecto del mínimo procesamiento y tratamiento con yerba mate sobre el potencial saludable y los atributos de calidad de manzanas Granny Smith [En línea]. En: *INNOTEC*, 12, pp.7-14. [Consulta: 20 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://ojs.latu.org.uy/index.php/INNOTEC/article/view/300> DOI: <https://doi.org/10.26461/12.01>
- Slongo, A. y Aragão, G., 2006. Factors affecting the thermal activation of *Neosartorya fischeri* in pineapple and papaya nectars. En: *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, pp.266-270. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000300021>
- Snyder, A. y Worobo, R., 2018. Fungal spoilage in food processing. Mini-review. En: *Journal of Food Protection*, 81(6), pp.1035-1040. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-031>
- Sobrero, S., Frison, L., Chiericatti, C., Aringoli, E., Basílico, J. y Basílico, M., 2013. Parámetros cinéticos como herramienta para la caracterización de aislados de *Aspergillus* sección *Nigri* [En línea]. En: *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4(2), pp.146-156. [Consulta: 20 de agosto de 2020]. Disponible en: [https://www.academia.edu/20349751/Par%C3%A1metros\\_cin%C3%A9ticos\\_como\\_herramienta\\_para\\_la\\_caracterizaci%C3%B3n\\_de\\_aislados\\_de\\_Asp%C3%A9rgillus\\_secci%C3%B3n\\_Nigri](https://www.academia.edu/20349751/Par%C3%A1metros_cin%C3%A9ticos_como_herramienta_para_la_caracterizaci%C3%B3n_de_aislados_de_Asp%C3%A9rgillus_secci%C3%B3n_Nigri)

- Syamaladevi, R., Lu, X., Sablani, S., Insan, K., Adhikari, A., Killinger, K., Rasco, B., Dhingra, A., Bandyopadhyay, A. y Annapure, U., 2012. Inactivation of *Escherichia coli* Population on Fruit Surfaces Using Ultraviolet-C Light: Influence of Fruit Surface Characteristics. En: *Food and Bioprocess Technology*, 6 (11), pp.2959-2973. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0989-0>
- Tardón, A., Obando, R., Hinojosa, A., Luchsinger, L. y Escalona, V., 2011. Efecto de la aplicación de radiación UV-C sobre la calidad de brotes de alfalfa mínimamente procesados en fresco [En línea]. En: *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 12(1), pp.87-93. [Consulta: 27 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81318808014>
- Van De Velde, F., Piagentini, A., Güemes, D. y Pirovani, M., 2013. Modelling changes in anthocyanins, total vitamin C, and colour as a consequence of peracetic acid washing disinfection of two cultivars of strawberries for fresh-cut processing. En: *International Journal of Food Science and Technology*, 48(5), pp.954-961. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijfs.12047>
- Vázquez Castilla, S., Guillén Bejarano, R., Jaramillo Carmona, S., Jiménez Araujo, A. y Rodríguez Arcos, R., 2012. *Funcionalidad de distintas variedades de arándanos* [En línea]. [s.l.]: [s.n.]. [Consulta: 18 de setiembre de 2020]. Disponible en: [https://cdn.blueberriesconsulting.com/2015/07/pdf\\_000121.pdf](https://cdn.blueberriesconsulting.com/2015/07/pdf_000121.pdf)
- Xu, F., Shenghou Wang, JieXu, ShiyangLiu y Guode, Li., 2016. Effects of combined aqueous chlorine dioxide and UV-C on shelf-life quality of blueberries. En: *Postharvest Biology and Technology*, 117, pp.125-131. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.01.012>
- Yaun, B., Summer, S., Eifert, J. y Marcy, J., 2004. Inhibition of pathogens on fresh produce by ultraviolet energy. En: *International Journal of Food Microbiology*, 90(1), pp.1-8. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00158-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00158-2)

# Interacciones entre el mejillón dorado y macroinvertebrados bentónicos nativos del Río Uruguay

## Interactions between the golden mussel and native benthic macroinvertebrates of Uruguay River

## Interações entre o mexilhão dourado e os macroinvertebrados bentônicos nativos do Rio Uruguai

Ivana Silva<sup>1, 2, \*</sup> <https://orcid.org/0000-0003-1999-9881>  
Ernesto Brugnoli<sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7304-1856>  
Cristhian Clavijo<sup>4</sup> <https://orcid.org/0000-0003-1381-4102>  
Alejandro D'Anatro<sup>5</sup> <https://orcid.org/0000-0002-4756-7325>  
Daniel E. Naya<sup>5</sup> <https://orcid.org/0000-0002-8311-9263>  
Franco Teixeira de Mello<sup>6</sup> <https://orcid.org/0000-0003-4904-6985>  
Giancarlo Tesitore<sup>6</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8097-729X>  
Iván González-Bergonzoni<sup>1, 2</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7727-362X>

\*Autor de contacto: [isilva@fcien.edu.uy](mailto:isilva@fcien.edu.uy)

<sup>1</sup> Departamento del Agua, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, Paysandú, Uruguay

<sup>2</sup> Departamento de Ecología y Biología Evolutiva, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

<sup>3</sup> Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales - Oceanografía y Ecología Marina, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>4</sup> Museo Nacional de Historia Natural, Montevideo, Uruguay

<sup>5</sup> Departamento de Ecología y Evolución, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>6</sup> Departamento de Ecología y Gestión Ambiental CURE, Universidad de la República, Maldonado, Uruguay

**Recepción:** 7 Setiembre 2020 **Aprobación:** 12 Mayo 2021

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional.

**Resumen:** Los efectos que *Limnoperna fortunei* ocasiona sobre los ecosistemas vienen siendo estudiados en los últimos años a nivel nacional. No obstante, las interacciones que este invasor establece con la fauna bentónica nativa no han sido determinadas en detalle. El objetivo de este estudio fue recopilar información sobre las interacciones entre el mejillón dorado y macroinvertebrados nativos del Río Uruguay, a través de (a) relevamiento bibliográfico, (b) registro fotográfico obtenido en campo y (c) análisis de datos de un experimento de colonización realizado previamente en litorales rocosos de este río. Las interacciones reportadas en la bibliografía refirieron mayoritariamente a interacciones directas de biofouling de *L. fortunei* sobre especies de bivalvos y gasterópodos nativos, con potencial efecto negativo para estos individuos. La documentación fotográfica permitió reportar, por primera vez en la región, una interacción directa de *L. fortunei* con la familia Spongillidae, mediante la cual estos poríferos cubren y sofocan a mejillones ya asentados. Finalmente, a través del experimento realizado *in situ* se encontró que el mejillón genera efectos negativos indirectos sobre algunos macroinvertebrados bentónicos nativos. Según el análisis de datos, una alta abundancia de mejillones asentados se relaciona con una reducción en las abundancias de dos de los grupos bentónicos nativos dominantes de este río, como son los gasterópodos y dípteros.

**Palabras clave:** *Limnoperna fortunei*, biofouling, fauna bentónica nativa, invasiones biológicas.

**Abstract:** The ecosystem effects of *Limnoperna fortunei* have been studied nationally in recent years. However, the interactions that this invader establishes with the native benthic fauna have not been determined in detail. The objective of this study was to collect information on the interactions between the golden mussel and macroinvertebrates native to the Uruguay River, through (a) bibliographic survey, (b) photographic record obtained in the field and (c) analysis of data from an experiment of colonization carried out previously on rocky shores of this river. The interactions reported in the bibliography mainly referred to direct interactions of *L. fortunei* biofouling on native bivalve and gastropod species, with a potential negative effect for these individuals. The photographic documentation specifically made it possible to report for the first time in the region, a direct interaction of *L. fortunei* with the Spongillidae family, through which these porifers cover and suffocate already settled mussels. Finally, through the experiment carried out *in situ*, it was found that the mussel generates indirect negative effects on some native benthic macroinvertebrates. According to the data analysis, a high abundance of settled mussels is related to a reduction in the abundances of two of the dominant native benthic groups of this river, such as gastropods and dipterans.

**Keywords:** *Limnoperna fortunei*, biofouling, native benthic fauna, biological invasions.

**Resumo:** Os efeitos que o *Limnoperna fortunei* causa nos ecossistemas foram estudados nos últimos anos em nível nacional. No entanto, as interações que este invasor estabelece com a fauna bentônica nativa não foram determinadas em detalhes. O objetivo deste estudo foi coletar informações sobre as interações entre o mexilhão dourado e macroinvertebrados nativos do Rio Uruguai, por meio de (a) levantamento

bibliográfico, (b) registro fotográfico obtenido en campo e (c) análisis de datos de un experimento de colonización realizada anteriormente en costões rochosos deste río. As interações relatadas na bibliografía referem-se principalmente às interações diretas de *L. fortunei* bioincrustantes em espécies nativas de bivalves e gastrópodes, com potencial efeito negativo para esses indivíduos. A documentação fotográfica especificamente possibilitou relatar, pela primeira vez na região, uma interação direta de *L. fortunei* com a família Spongillidae, através da qual esses poríferos cobrem e sufocam mexilhões já assentados. Por fim, por meio do experimento realizado *in situ*, constatou-se que o mexilhão gera efeitos negativos indiretos sobre alguns macroinvertebrados bentônicos nativos. De acordo com a análise dos dados, uma alta abundância de mexilhões assentados está relacionada a uma redução nas abundâncias de dois grupos bentônicos nativos dominantes deste río, como gastrópodes e dípteros.

**Palavras-chave:** *Limnoperna fortunei*, bioincrustação, fauna bentônica nativa, invasões biológicas.

## INTRODUCCIÓN

El mejillón dorado (*Limnoperna fortunei*) es una de las especies invasoras de ecosistemas de agua dulce de Sudamérica que ha provocado mayor interés para la región debido a los altos costos económicos que genera (Cataldo, et al., 2003; Brugnoli, et al., 2006; Boltovskoy, et al., 2015). Desde su ingreso al Río de la Plata en la década del 90 (Pastorino, et al., 1993; Scarabino y Verde, 1995), comenzó una rápida dispersión, encontrándose actualmente en varios afluentes del Río Uruguay, Río Negro, Río Santa Lucía, Río de la Plata, Laguna Merín y Laguna del Sauce (Brugnoli, et al., 2005; Brugnoli, et al., 2011; Clemente, et al., 2015). El éxito en la dispersión y asentamiento del mejillón dorado está dado por las características biológicas de la especie. Estos bivalvos, de hábito epifaunal, son organismos dioicos de fertilización externa que producen un importante número de larvas de vida libre (Ezcurra de Drago, et al., 2006). Estas larvas presentan varios estadios de desarrollo, y el último de ellos, la larva plantígrada (Ezcurra de Drago, et al., 2006), puede fijarse en distintos tipos de sustratos duros (natural o artificial) por medio de un fuerte bise (Darrigran, 2002). Así, la especie puede asentarse fácilmente en un nuevo sitio, formando agregaciones de miles de individuos por metro cuadrado en un corto periodo de tiempo (Darrigran, 2002).

Estas agregaciones pueden generar importantes incrustaciones en infraestructuras de industrias y centrales hidroeléctricas que utilizan el agua de río, obstruyendo diferentes tipos de filtros y causando daños en las plantas de purificación de agua (Cataldo, et al., 2003; Brugnoli, et al., 2006; Boltovskoy, et al., 2015). Además, esta invasión provoca importantes daños en embarcaciones, ya que ejemplares de *L. fortunei* pueden adherirse a sus cascos, así como a otras partes sumergidas o en contacto con el agua (filtros, hélices, válvulas), generando problemas para su funcionamiento e hidrodinámica (Pérez, 2012; Boltovskoy, et al., 2015). Este fenómeno, conocido como *macrofouling*, implica grandes pérdidas

económicas para el país debido al aumento de las tareas adicionales de mantenimiento de las estructuras afectadas y la generación de distintos planes de manejo de la especie (Brugnoli, et al., 2006).

Por otra parte, se ha demostrado que la invasión del mejillón dorado implica diversas consecuencias ecológicas. En este sentido, esta especie puede actuar como un agente estructural dominante (Crooks, 2002), generando alteraciones sobre distintos niveles del ecosistema, modificando la estructura trófica, el hábitat físico, la disponibilidad y/o calidad de nutrientes, entre otras (por ejemplo, Boltovskoy, et al., 2009; Sylvester, et al., 2007; Duchini, et al., 2018). Específicamente, debido a la actividad filtradora de *L. fortunei* (Sylvester, et al., 2005; Cataldo, et al., 2012a), la misma puede producir una disminución del plancton y un consecuente aumento de la disponibilidad de nutrientes (Cataldo, et al., 2012a). En línea con esto, una disminución del material en suspensión puede implicar, a su vez, un aumento en la transparencia del agua (Boltovskoy, et al., 2009). Además, el material particulado extraído de la columna de agua es posteriormente transferido al sustrato bentónico en forma de heces y pseudoheces, generando un enriquecimiento en los sedimentos del río (Welker y Walz, 1998). La modificación del sustrato podría generar finalmente una mayor disponibilidad de alimento para algunos taxa y espacios disponibles como refugio ante depredadores (Darrigran, et al., 1998; Darrigran, 2002; Sylvester, et al., 2007; Sardiña, et al., 2008).

En investigaciones previas realizadas en los principales sistemas hídricos invadidos de la cuenca del Plata, como el Río Paraná y el Río de la Plata, se ha demostrado que los cambios producidos por *L. fortunei* en el ambiente implican, a su vez, importantes efectos sobre la fauna nativa, particularmente sobre los macroinvertebrados bentónicos (Mansur, et al., 1999; 2003; Sylvester, et al., 2007; Boltovskoy y Correa, 2015; Linares, et al., 2017; Duchini, et al., 2018). La mayoría de los estudios describen a este organismo invasor como un facilitador de varios grupos de macroinvertebrados bentónicos (por ejemplo, Oligochaeta, Nematoda, Hirudinea), viéndose posiblemente beneficiados por una mayor disponibilidad de recursos alimenticios y refugio ante depredadores, aumentando su abundancia en sitios colonizados (Sylvester, et al., 2007; Boltovskoy y Correa, 2015; Duchini, et al., 2018). Por otra parte, la literatura ha sugerido que probablemente esta invasión genera importantes impactos negativos sobre otros grupos de invertebrados nativos. Linares y otros (2017) destacan la presencia conjunta de *L. fortunei* con otro bivalvo invasor, como *Corbicula fluminea*, en varios embalses colonizados en Brasil, donde pueden disminuir las abundancias de algunos grupos, tales como Chironomidae, debido a probables cambios en los patrones de sedimentación del fondo del río. En tanto, Mansur y otros (1999 y 2003) reportaron el asentamiento de *L. fortunei* sobre gasterópodos, como *Pomacea canaliculata*, y bivalvos nativos, como *Diplodon koseretzi* y *Leila blainvilliana*, provocando una posible disminución de estos moluscos por oclusión,

impedimento para abrir y cerrar sus valvas; lo que directamente afecta su capacidad de ingestión y, por lo tanto, los animales mueren. Asimismo, otros autores han informado que en el Río Paraná este mejillón tiene la capacidad de fijarse a cangrejos nativos, como *Aegla platensis* o *Trichodactylus borellianus*, adhiriéndose incluso a individuos de menor peso y longitud que los del mismo mejillón (Lopes, et al., 2009; Rojas Molina y Williner, 2013).

Para Uruguay, y específicamente para grandes ríos de nuestro país, las interacciones entre *Limnoperna* e invertebrados nativos no han sido identificadas en detalle. Sin embargo, en los últimos años, se ha avanzado en la comprensión de la ecología de esta invasión, y de sus principales efectos sobre el ecosistema, específicamente en el Río Uruguay (Cataldo, et al., 2012b; Eugui, et al., 2012; Silva, et al., 2020). El objetivo del presente trabajo es recopilar la información disponible sobre las interacciones entre *L. fortunei* y macroinvertebrados bentónicos nativos del Río Uruguay, obtenida en primera instancia de investigaciones publicadas, de registros fotográficos puntuales realizados en campo, y de un experimento de colonización de mejillones y fauna acompañante *in situ*, realizado en litorales rocosos del bajo Río Uruguay.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Revisión bibliográfica

Se realizó una búsqueda bibliográfica en el buscador "Google Scholar", utilizando las palabras clave: "Río Uruguay, Uruguay River, *Limnoperna fortunei*, mejillón dorado, golden mussel, invertebrados bentónicos, benthic invertebrates", seleccionando aquellos trabajos que documentaron interacciones entre esta especie invasora y diferentes grupos de macroinvertebrados bentónicos de dicho río.

### Registro fotográfico

Se solicitó a los grupos de investigación que integran los autores del presente trabajo registros fotográficos de interacciones entre mejillón e invertebrados observadas en campo y en diferentes sitios del Río Uruguay. Estos registros se basaron principalmente en el biofouling sobre otros organismos y la potencial competencia por espacio.

## Experimento de colonización de mejillones y fauna bentónica acompañante *in situ*

Mediante un experimento *in situ* en litorales rocosos del Río Uruguay, se analizó la relación entre abundancias de *L. fortunei* y de macroinvertebrados nativos dominantes.

Se construyeron ocho jaulas (1.0 m de largo x 1.0 m de ancho x 0.5 m de alto) cubiertas con una malla metálica (tamaño de malla: 5.0 mm). En el fondo de cada una de estas jaulas se colocaron 32 ladrillos, cubriendo todo el piso, los cuales funcionaron como sustratos artificiales para el asentamiento de los organismos. Como fue demostrado en trabajos previos (de Melo Rosa, et al., 2019), los peces pueden ejercer un importante control sobre la abundancia del mejillón; por lo tanto, las jaulas fueron diseñadas de forma estratégica: cuatro de ellas cubiertas completamente por tejido (evitando el acceso de depredadores) y otras cuatro con dos de sus lados laterales desprovistos de tejido (permitiendo el acceso a depredadores). Este diseño aseguró la existencia de un importante gradiente en las abundancias del mejillón, permitiendo analizar las correlaciones entre su abundancia y la de los macroinvertebrados nativos.

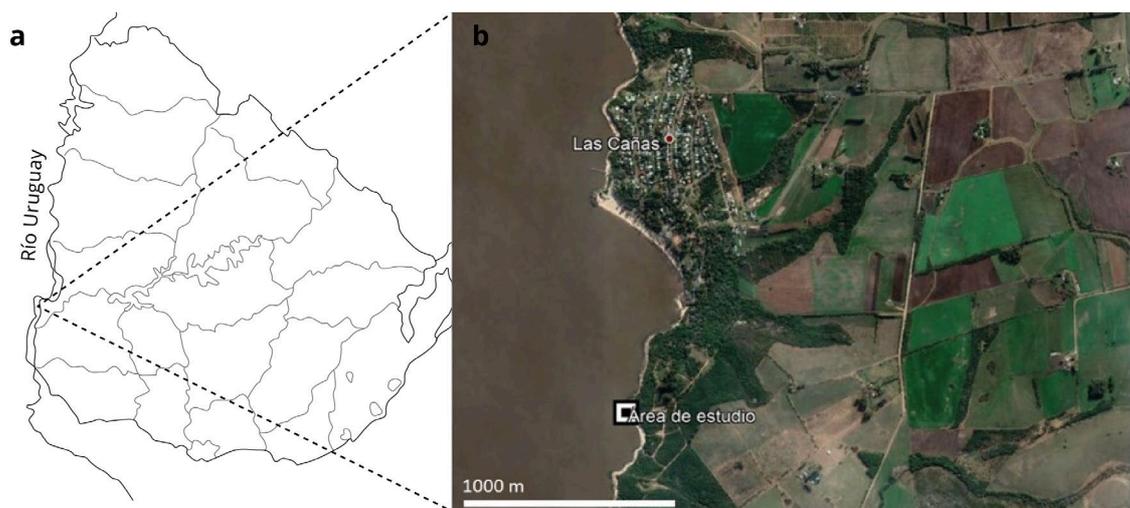
El área de estudio se localizó en el balneario Las Cañas (34° 10'25 "S, 58° 21'29" O), departamento de Río Negro (Figura 1a, b). En setiembre de 2016 se inició el experimento a efectos de anteponerse al periodo de asentamiento larval, el cual ocurre, según varios autores, en los meses de primavera, cuando la temperatura del agua supera los 17°C (Darrigran, et al., 2002; Brugnoli et al., 2011).

Las jaulas fueron ancladas firmemente al fondo del río, a una distancia de 2 a 10 m entre ellas; y se intercalaron según el tipo de tratamiento: acceso y exclusión de depredadores. Las profundidades a las que se colocaron las jaulas variaron entre 1.2 y 1.7 m en promedio durante el período de muestreo, debido a las fluctuaciones del nivel del río; sin embargo, en ningún caso la profundidad entre tratamientos fue diferente (ANOVA,  $gl=16$ ,  $F=0.062$ ;  $p=0.8$ ). Asimismo, cuatro jaulas (dos de acceso y dos de exclusión) fueron colocadas en una bahía (con poca influencia de las olas), y otras cuatro en una zona expuesta a mayor oleaje (a aproximadamente 20 m de la bahía), para integrar los potenciales factores de variación y representar las condiciones ambientales del sitio.

El experimento se llevó a cabo a lo largo de 181 días, y se tomaron muestras cada 15-20 días. Finalmente, los módulos fueron retirados del río en marzo de 2017. Entre los muestreos del día 110 y el día 181, la inspección visual de los sustratos indicó claramente que el asentamiento de mejillones había ocurrido, registrándose pocos ejemplares para el día 110 (268 ind.m<sup>-2</sup> en promedio, considerando ambos tratamientos) en comparación con el día 181 (763 ind.m<sup>-2</sup> en promedio, considerando ambos tratamientos) (ANOVA,  $df=45$ ,  $F=70.44$ ,

$p < 0.0001$ ). Por tanto, con el fin de estudiar la relación entre abundancias de mejillón y los macroinvertebrados nativos encontrados, se tomó al muestreo del día 110 como el periodo de tiempo en el que el mejillón estuvo ausente (o en bajas densidades) y al muestreo del día 181 como el periodo posterior a la colonización de los sustratos, es decir, cuando el mejillón estuvo presente (y en altas densidades).

En cada muestreo se seleccionaron al azar tres ladrillos de cada módulo y se procedió a remover todos los mejillones y macroinvertebrados nativos allí asentados, utilizando diferentes pinzas y filtrando cada muestra por un tamiz de  $300\mu\text{m}$  de apertura de malla. Las muestras obtenidas se conservaron en alcohol 95% para su posterior análisis. En el laboratorio de Ecología y Biología Evolutiva del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), los macroinvertebrados recolectados fueron colocados en una placa de Petri y con la ayuda de lupa binocular y claves taxonómicas (Costa, et al., 2006; Domínguez, et al., 2006; Domínguez y Fernández, 2009), cada ejemplar fue identificado al menor nivel taxonómico posible.



**Figura 1.** a) Mapa de Uruguay indicando la ubicación del balneario Las Cañas, en la porción inferior del Río Uruguay. b) Imagen de Google Earth mostrando el área de estudio localizada en Las Cañas, Río Negro.

Los ejemplares identificados fueron clasificados según la abundancia de los grupos más frecuentes (aquellos presentes en al menos el 60% de los sustratos).

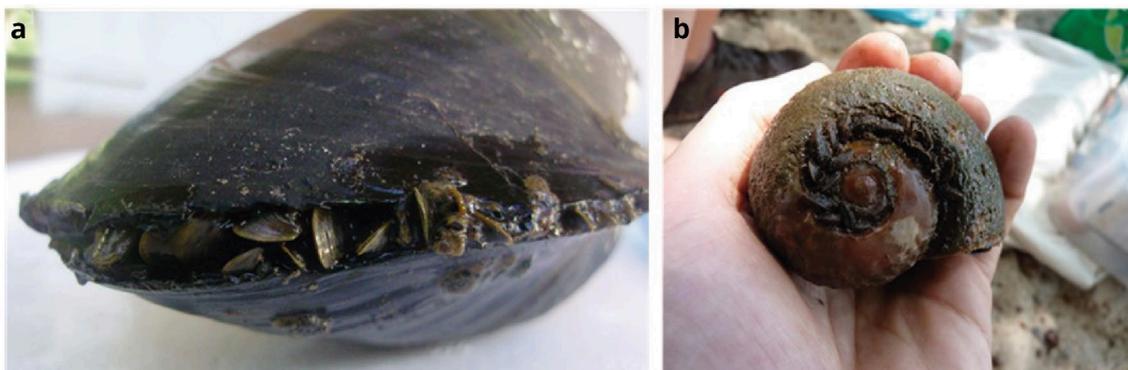
La relación entre la abundancia de mejillones y de cada grupo de macroinvertebrados (teniendo en cuenta ambos muestreos, día 110 y 181 del experimento) fue analizada mediante el ajuste de modelos lineales generalizados mixtos (GLMM, por sus siglas en inglés,  $\alpha=0.05$ ), considerando la abundancia de *L. fortunei* como variable explicativa categórica de efecto fijo, y la jaula como

variable de efecto aleatorio. Dado que los datos de abundancia de cada grupo de invertebrados fueron tomados como conteos, se probaron dos distribuciones diferentes (gamma y poisson) con el fin de buscar aquella que mejor se ajustara a dicha variable de respuesta. La selección de la distribución de cada variable de respuesta se realizó, en todos los casos, mediante la función *fitdist* del paquete *fitdistrplus* (Delignette-Muller y Dutang, 2015), y se comprobó la bondad de ajuste de estas distribuciones con la función *gofstat* en el *software R*. Finalmente, la validación de cada uno de los modelos ajustados se realizó mediante los gráficos de diagnóstico de los residuos (de tipo *Pearson*) (Logan, 2010), en *R*.

## RESULTADOS

### Revisión bibliográfica y registro fotográfico

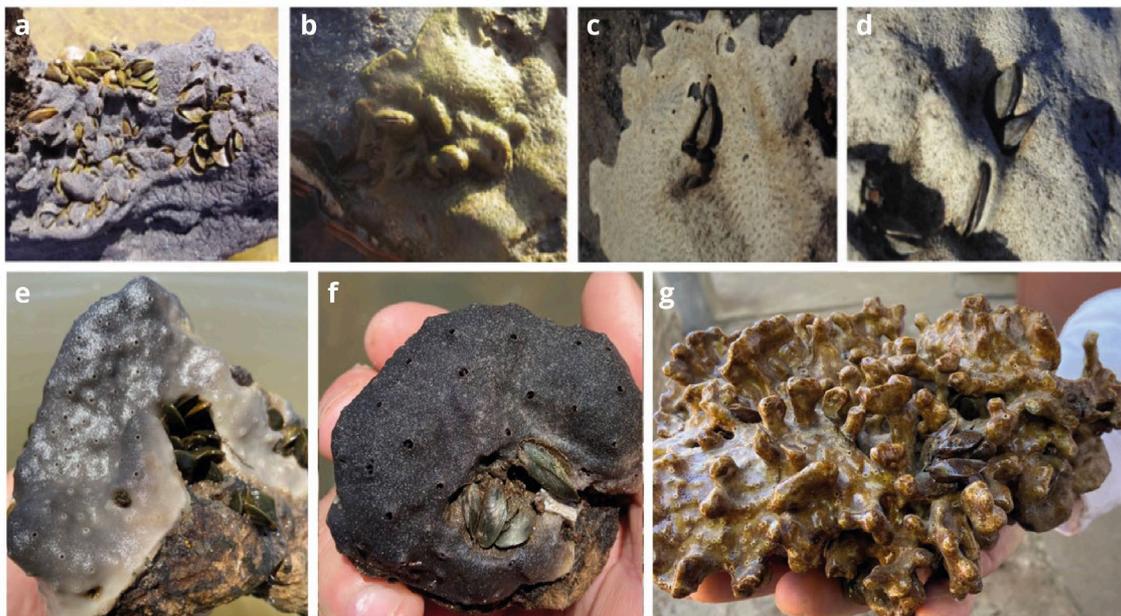
De acuerdo con los criterios de búsqueda escogidos, no se encontraron publicaciones con foco en los efectos de la invasión de *L. fortunei* sobre la fauna bentónica nativa del Río Uruguay. Sin embargo, se encontraron algunos trabajos presentados en congresos y evidencia fotográfica que indican interacciones puntuales de este bivalvo invasor con otros organismos. Específicamente, Eugui y otros (2012) reportaron biofouling de *Limnoperna* sobre algunos gasterópodos, como *Pomacea insularum* y *P. megastoma*. Asimismo, en el bajo Río Uruguay se han registrado ejemplares de mejillón dorado asentados incluso dentro de algunos bivalvos nativos vivos, como *Leila blainvilliana* (Cristhian Clavijo, obs. pers., Figura 2a), particularmente en la localidad de Fray Bentos, Departamento de Río Negro. Además, se han registrado asentamientos puntuales de mejillones sobre grandes gasterópodos, como *P. maculata*, en la localidad de Nueva Palmira, Departamento de Colonia (Cristhian Clavijo, obs. pers., Figura 2b).



**Figura 2.** Ejemplares de mejillón dorado dentro de *L. blainvilliana* (a) y sobre *P. maculata* (b). Fotos: Cristhian Clavijo.

Por otra parte, se han registrado mejillones dorados cubiertos parcial o totalmente por ejemplares de *Trochospongilla repens*, en la zona de Fray Bentos

(Cristhian Clavijo, obs. pers., Figura 3a) y sobre otras esponjas de agua dulce sin identificar, en la localidad de Bella Unión, Departamento de Artigas (Sebastián Gómez Barboza, obs. pers., Figura 3b-d), en la localidad La Concordia, Departamento de Soriano, y en San Javier (Iván González-Bergonzoni, obs. pers., Figura 3e y f, respectivamente) y Casablanca (Iván González-Bergonzoni, obs. pers. Figura 3g), Departamento de Paysandú. Esta documentación gráfica, junto con observaciones de campo, demuestra que las especies de esponjas nativas tienen la capacidad de cubrir las colonias de mejillones asentados en sustratos duros.



**Figura 3.** a) Individuos de mejillón dorado siendo cubiertos por *Trochospongilla repens* (Porífera, Spongillidae), Foto: Cristhian Clavijo. b-g) Individuos de mejillón dorado siendo cubiertos por ejemplares de la familia Spongillidae, especie sin identificar. Fotos: Sebastián Gómez-Barboza e Iván González-Bergonzoni.

### Experimento de exclusión y colonización *in situ*

Se colectaron e identificaron 33 taxa de macroinvertebrados, considerando ambos muestreos (antes y después del asentamiento masivo del mejillón) (Tabla 1). Dentro de los macroinvertebrados identificados, se destacan los gasterópodos (*Potamolitus* spp., *Heleobia* spp., Chilinidae, entre otros) y los Chironomidae. Además, se lograron identificar cuatro familias de efemerópteros (Baetidae, Caenidae, Leptohiphidae, Leptophlebiidae), dos familias de tricópteros (Polycentropodidae y Philopotamidae), una familia de coleópteros (Elmidae), una familia de hemípteros (Corixidae) y dos tipos de almejas (*Eupera* sp. y Curbiculidae), entre otros (Tabla 1).

Por otra parte, agrupando los taxa colectados en niveles taxonómicos superiores (Subclase y Orden), se encontró que los gasterópodos, dípteros, efemerópteros y tricópteros fueron los grupos destacados, estando presentes en el 100%, 98%, 96% y 64% de los sustratos, respectivamente. Estos cuatro grupos se catalogan como macroinvertebrados frecuentes.

**Tabla 1.** Densidad media ( $\pm$  desviación estándar; ds) de todos los macroinvertebrados recolectados en cada tratamiento (acceso y exclusión) para cada muestreo: antes y después del asentamiento masivo de mejillones en los sustratos. Se encuentran ordenados por Filo (en orden alfabético), luego por Subclase u Orden, y finalmente por el mínimo nivel taxonómico identificado: Familia, Subfamilia, Tribu, Género y Especie. Se muestra la densidad total promedio y la riqueza de taxa. \*s/i = taxón sin identificar.

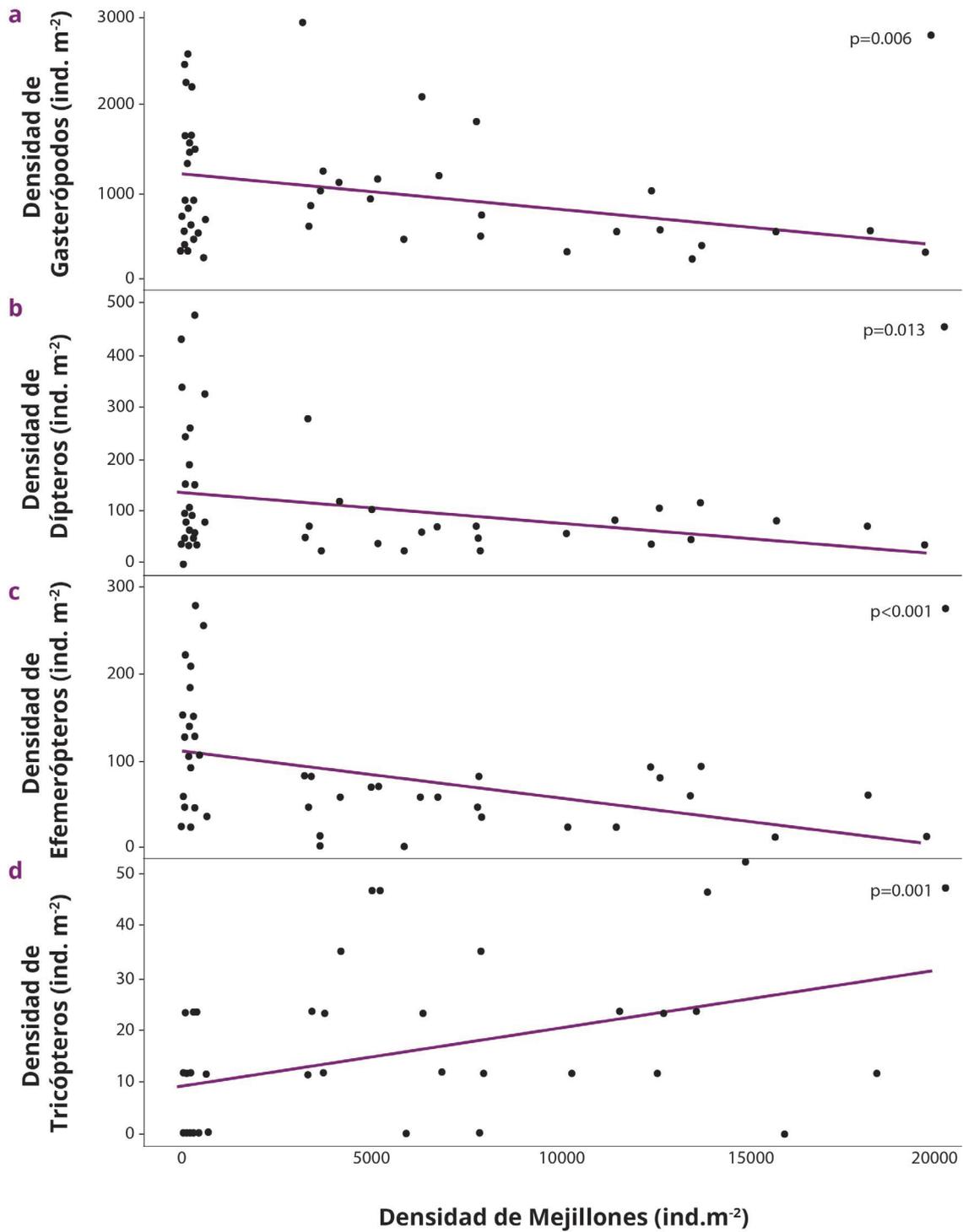
| Filo                       | Subclase /Orden   | Familia Subfamilia/Tribu/ Género/Especie | Antes             |                   | Después           |                  |             |
|----------------------------|-------------------|--|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------|
|                            |                   |  | Acceso            | Exclusión         | Acceso            | Exclusión        |             |
| Annelida                   | Hirudinea         | Hirudinea s/i                            | 1.0 ± 3.4         | 1.0 ± 3.4         | 1.1 ± 3.5         | 1.0 ± 3.4        |             |
|                            | Oligochaeta       | Oligochaeta s/i                          | 5.0 ± 9.2         | 18.4 ± 43.1       | 0                 | 32.0 ± 49.4      |             |
| Arthropoda                 | Amphipoda         | Hyalellidae                              | 1 ± 3.4           | 1.0 ± 3.4         | 0                 | 0                |             |
|                            | Coleoptera        | Elmidae                                  | 0                 | 2.9 ± 7.2         | 2.1 ± 4.7         | 4.8 ± 6.0        |             |
|                            | Collembola        | Collembola s/i                           | 1.9 ± 4.5         | 0                 | 1.1 ± 3.5         | 0                |             |
|                            | Decapoda          | Aegliidae                                | 0                 | 1.0 ± 3.4         | 0                 | 0                |             |
|                            | Diptera           | Chironomidae                             |                   | 32.0 ± 31.4       | 86.2 ± 111.0      | 26.4 ± 23.3      | 16.5 ± 16.0 |
|                            |                   | Chiron. Tanypodinae                      |                   | 26.2 ± 24.4       | 22.3 ± 26.9       | 22.2 ± 34.0      | 10.7 ± 18.2 |
|                            |                   | Chiron. Orthoclaadiinae                  |                   | 25.2 ± 40.8       | 20.4 ± 38.1       | 7.4 ± 9.4        | 9.7 ± 12.0  |
|                            |                   | Chiron. Chironominae                     |                   | 0                 | 11.0 ± 36.9       | 7.4 ± 15.0       | 4.8 ± 9.2   |
|                            |                   | Chiron. Chiron. Tanytarsini              |                   | 27.1 ± 52.1       | 41.7 ± 78.5       | 23.3 ± 26.5      | 11.6 ± 16.4 |
|                            |                   | Chiron. Chiron. Chironomini              |                   | 0                 | 0                 | 0                | 1.9 ± 4.5   |
|                            |                   | Ceratopogonidae                          |                   | 0                 | 0                 | 1.1 ± 3.5        | 0           |
|                            |                   | Ephemeroptera                            | Ephemeroptera s/i | 5.8 ± 20.1        | 3.9 ± 10.3        | 0                | 1.0 ± 3.4   |
|                            |                   | Baetidae                                 |                   | 20.4 ± 33.3       | 9.7 ± 14.0        | 2.1 ± 4.7        | 2.9 ± 5.3   |
|                            |                   | Caenidae                                 |                   | 19.4 ± 19.3       | 17.4 ± 21.4       | 1.1 ± 3.5        | 1.0 ± 3.4   |
|                            |                   | Leptohyphidae                            |                   | 56.2 ± 31.7       | 70.7 ± 63.0       | 38.1 ± 19.5      | 43.0 ± 29.5 |
|                            |                   | Leptophlebiidae                          |                   | 26.2 ± 14.1       | 17.4 ± 15.3       | 7.4 ± 9.4        | 3.9 ± 10.3  |
|                            |                   | Hemiptera                                | Hemiptera s/i     | 1.0 ± 3.4         | 0                 | 0                | 0           |
|                            |                   | Corixidae                                |                   | 1.0 ± 3.4         | 0                 | 1.1 ± 3.5        | 0           |
|                            |                   | Odonata                                  | Zygoptera         | 1.9 ± 4.5         | 1.0 ± 3.4         | 5.3 ± 8.0        | 5.8 ± 9.3   |
| Oribatida                  | Oribatida s/i     | 0  | 0                 | 1.1 ± 3.5         | 0                 |                  |             |
| Trichoptera                | Trichoptera s/i   |  | 3.9 ± 7.6         | 2.9 ± 7.2         | 10.6 ± 11.0       | 12.6 ± 15.3      |             |
|                            | Polycentropodidae |  | 1.9 ± 4.5         | 3.9 ± 7.6         | 8.5 ± 14.8        | 8.7 ± 11.2       |             |
|                            | Philopotamidae    |  | 0                 | 0                 | 0                 | 2.9 ± 7.2        |             |
| Trombidiformes             | Hydrachnidae      |  | 3.9 ± 5.7         | 1.0 ± 3.4         | 0                 | 0                |             |
| Mollusca                   | Bivalvia          | <i>Limnoperna fortunei</i>               | 228.4 ± 163.1     | 307.8 ± 156.4     | 6943.3 ± 3869.0   | 6943.3 ± 3869.0  |             |
|                            | Gastropoda        | <i>Pomacea megastoma</i>                 | 0                 | 0                 | 0                 | 1.0 ± 3.4        |             |
|                            |                   | Chiliniidae                              | 10.7 ± 11.6       | 21.3 ± 26.3       | 5.3 ± 10.9        | 2.9 ± 5.3        |             |
|                            |                   | <i>Heleobia</i> spp.                     | 14.5 ± 39.7       | 29.1 ± 31.9       | 29.6 ± 35.7       | 35.9 ± 36.3      |             |
|                            |                   | Planorbidae                              | 0                 | 0                 | 1.1 ± 3.5         | 1.0 ± 3.4        |             |
|                            |                   | <i>Potamolithus</i> spp.                 | 929.3 ± 611.5     | 1191.9 ± 796.5    | 1204.0 ± 763.0    | 556.2 ± 302.2    |             |
|                            | Sphaeriida        | <i>Eupera</i> sp.                        | 0                 | 0                 | 1.1 ± 3.5         | 0                |             |
|                            | Veneroida         | Corbiculidae                             | 0                 | 0                 | 1.0 ± 3.4         | 0                |             |
| <b>Densidad total ± ds</b> |                   |  | <b>1209 ± 571</b> | <b>1561 ± 718</b> | <b>1432 ± 729</b> | <b>791 ± 355</b> |             |
| <b>Riqueza total (S)</b>   |                   |  | <b>22</b>         | <b>22</b>         | <b>24</b>         | <b>23</b>        |             |

A partir de los modelos ajustados, se encontró que existe relación lineal negativa significativa entre las abundancias de los grupos de invertebrados bentónicos nativos más frecuentes y las abundancias de *L. fortunei*. Específicamente, se encontró que las abundancias de gasterópodos, dípteros y efemerópteros se reducen significativamente a medida que las abundancias de mejillones aumentan ( $p=0,006$ ;  $0,013$ ;  $0,0001$ , respectivamente) (Tabla 2; Figura

4a, b y c). Contrariamente, las abundancias de tricópteros aumentan conforme se incrementa la abundancia de mejillón dorado ( $p=0,001$ ) (Tabla 2; Figura 4d).

**Tabla 2.** Modelos lineales generalizados de efectos mixtos (GLMM, por sus siglas en inglés) ajustados para la abundancia de cada grupo de macroinvertebrados nativos como variable de respuesta, utilizando la abundancia de mejillón como variable explicativa de efecto fijo y la jaula como variable de efecto aleatorio. Se detalla el modelo seleccionado, su significancia (p-valor) y F-valor, y el porcentaje de varianza explicada por el mismo.

| Variable de respuesta | Modelo final     | F     | p      | % de varianza explicada |
|-----------------------|------------------|-------|--------|-------------------------|
| Gastropoda            | GLMM binom. neg. | 8,58  | 0,006  | 26%                     |
| Diptera               | GLMM binom. neg. | 6,27  | 0,013  | 19%                     |
| Ephemeroptera         | GLMM binom. neg. | 13,17 | 0,0001 | 26%                     |
| Trichoptera           | GLMM poisson     | 10,81 | 0,001  | 14%                     |



**Figura 4.** Densidad de cada grupo de macroinvertebrados bentónicos frecuentes del bajo Río Uruguay en función de la abundancia de mejillones. Se indica la significancia del modelo (y de las relaciones encontradas) por medio del p-valor.

## DISCUSIÓN

A pesar de que las implicancias ecosistémicas de la invasión del mejillón dorado han sido estudiadas en sistemas dulceacuícolas de Sudamérica, como el Río Paraná o el Río de la Plata (Mansur, et al., 1999; 2003; Sylvester, et al., 2007; Boltovskoy y Correa, 2015; Linares, et al., 2017; Duchini, et al., 2018), la información existente sobre las consecuencias directas e indirectas de este invasor sobre la fauna bentónica nativa al momento es escasa y poco difundida. En este trabajo, se sintetiza la información encontrada sobre los principales efectos que tiene la invasión de este mejillón sobre grupos particulares de macroinvertebrados bentónicos nativos del Río Uruguay, el sistema hídrico con mayor caudal de nuestro país.

Mediante la búsqueda bibliográfica y los registros fotográficos reportados, se encontró específicamente que los mejillones interactúan con varios grupos de moluscos autóctonos (incluyendo gasterópodos y bivalvos). A través del biofouling provocan problemas en la locomoción, y un aumento del riesgo de depredación, ya que se obstruyen las estructuras de protección del organismo (por ejemplo, opérculos, valvas) (Eugui, et al., 2012). Estos registros son consistentes con otros reportes previos para otros sistemas. Por ejemplo, Mansur y otros (1999) encontraron ejemplares de mejillones fijados al caparazón de *Corbicula* spp. y de *Diplodon koseritzi* próximos a las aberturas de inhalación y exhalación, pudiendo provocar el sofocamiento de estos organismos. Además, Mansur y otros (2003) también reportaron interacciones entre el mejillón y otros moluscos: por ejemplo, se ha documentado la bioincrustación de este invasor sobre el bivalvo *L. blainvilliana*, y en gasterópodos, como *Pomacea canaliculata*. Estos reportes también son consistentes con lo indicado por Scarabino (2004), quien establece por medio de una revisión bibliográfica los registros del biofouling generado por *Limnoperna* sobre la malacofauna de varios sistemas de agua dulce sudamericanos. En este sentido, Soutullo y otros (2013) han destacado la implicancia de este invasor como uno de los principales factores de riesgo para los grupos de moluscos prioritarios para la conservación en Uruguay.

Por otro lado, las interacciones observadas con los poríferos nativos parecen ser negativas para los mejillones, ya que tanto el registro fotográfico como las observaciones de campo muestran especímenes del mejillón dorado que quedan completamente cubiertos por la esponja, imposibilitando su apertura de valvas. Más aún, en el interior de las colonias de poríferos se observan valvas cerradas de mejillones muertos (Iván González-Bergonzoni, obs. pers.). Si bien las interacciones con diferentes taxa que componen la fauna bentónica se han inferido con base en extensas revisiones bibliográficas (Sylvester y Sardiña, 2015), en ellas no se reporta la posible interacción entre el mejillón dorado y esponjas de agua dulce. Este registro de interacción entre el mejillón dorado y especies de

Porífera del Río Uruguay, en conjunto con observaciones similares registradas recientemente en afluentes de Brasil (Fortunato, 2021), resulta sumamente novedoso para la región. Durante el comienzo de la invasión del mejillón dorado en el Río Paraná, un estudio sobre esponjas de agua dulce de Argentina discutió el potencial efecto negativo del invasor *L. fortunei*, dado que posiblemente ambos compitan por el alimento y por el espacio (Ezcurra de Drago, 2004). Sin embargo, si bien esto es cierto, las observaciones aquí realizadas sugieren que en una competencia por el espacio las esponjas son capaces de desplazar (cubriendo totalmente) a los mejillones.

Las aproximaciones experimentales realizadas en el bajo Río Uruguay (Silva, et al., 2020), en conjunto con los resultados aquí descritos, destacan que efectivamente la colonización masiva de mejillones ocasiona consecuencias para la fauna de macroinvertebrados nativos, consideradas negativas para algunos grupos (por ejemplo, gasterópodos y dípteros) y positivas para otros (por ejemplo, tricópteros). Específicamente, se encontró que las abundancias de varios de los grupos de macroinvertebrados bentónicos se correlacionan con las abundancias de mejillones. Particularmente, se destaca que los gasterópodos, dípteros y efemerópteros pueden verse seriamente afectados ante esta invasión, disminuyendo significativamente sus abundancias conforme aumenta la abundancia del mejillón en los sustratos. Las causas por las cuales estos invertebrados podrían verse tan afectados ante dicha invasión aún no han sido estudiadas en detalle. Sin embargo, podría sugerirse que además de las bioincrustaciones realizadas sobre grandes gasterópodos y bivalvos nativos (Darrigran, et al., 1998), la mayor acumulación de materia orgánica en el sustrato bentónico, producido por las heces y pseudoheces de miles de mejillones, implicaría un menor acceso de luz, generando una afectación en el crecimiento de las algas bentónicas y, por lo tanto, una disminución en el perifiton disponible en los sustratos adyacentes a las colonias de *L. fortunei*. El perifiton consiste en el alimento principal de muchos gasterópodos, efemerópteros y quironómidos (Cummins y Klug, 1979). Una menor disponibilidad de este recurso podría provocar un desplazamiento de estos taxa.

Por otra parte, se encontró que la abundancia de tricópteros aumentó ante la presencia de mejillones en los sustratos. Esto coincide con la mayoría de las investigaciones previas (Boltovskoy, et al., 2009; Karatayev, et al., 2010; Burlakova, et al., 2012; Duchini, et al., 2018) que señalan a la capacidad de *L. fortunei* como facilitadora de varios grupos de invertebrados nativos en el río Paraná y Río de la Plata. Estos estudios destacan que algunos grupos con hábitos alimenticios de tipo sedimentívoro (por ejemplo, Oligochaeta y Nematoda) se ven favorecidos por la presencia del mejillón dorado, aumentando significativamente sus abundancias luego de la invasión. Esta facilitación podría estar asociada a una mayor disponibilidad de alimento por enriquecimiento de los sedimentos con

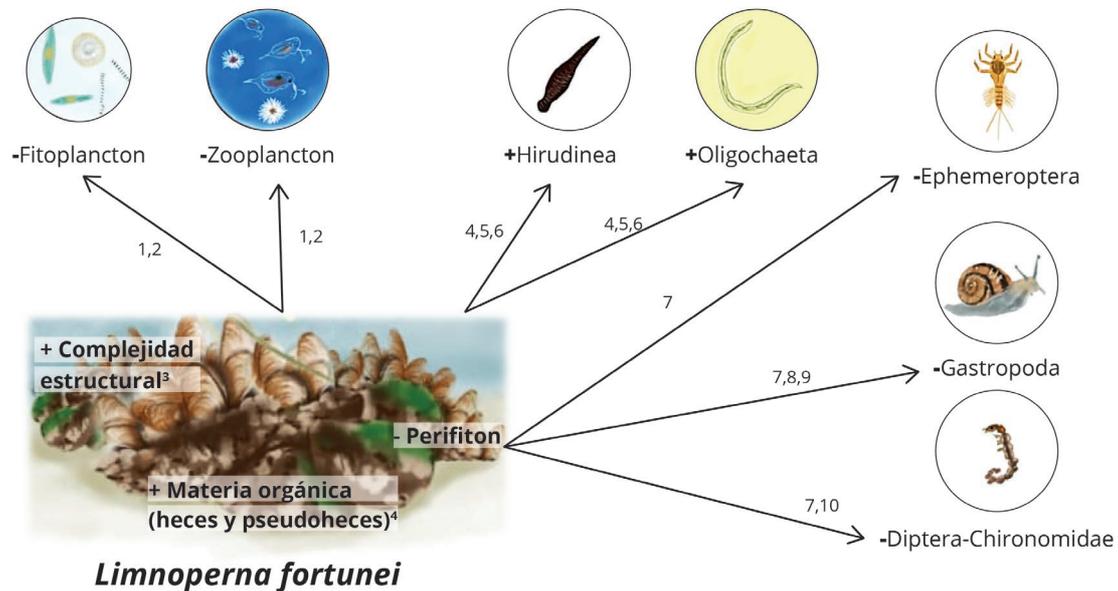
materia orgánica (Sardiña, et al., 2008; Boltovskoy y Correa, 2015) (Figura 5). En dichos trabajos también se destaca el aumento de organismos predadores, como los hirudíneos, ante la presencia de mejillones, lo cual podría estar dado por una mayor complejidad estructural que brindaría mayores oportunidades de “caza”.

Si bien en este estudio no se determinó en detalle la taxonomía, desconociendo los hábitos funcionales de los tricópteros colectados, podría sugerirse que los mismos estarían siendo beneficiados por el aporte alimenticio y estructural que brindan las colonias de mejillones. Sin embargo, se vuelve necesaria una identificación más detallada para poder obtener conclusiones más certeras al respecto.

De acuerdo con la información recopilada en la revisión bibliográfica y en estudios propios, se sugiere que la invasión del mejillón dorado en grandes ríos, y específicamente en el Río Uruguay, implica diversas consecuencias para las comunidades bentónicas, dadas por una compleja interacción de diferentes mecanismos. En este sentido, se generan efectos positivos para algunos macroinvertebrados nativos, y negativos para otros grupos (Figura 5). Por ejemplo, algunos de los efectos positivos hallados estriban en la alteración del hábitat próximo a las colonias, que se vuelve favorable para quienes puedan refugiarse y/o alimentarse en los espacios intersticiales, altamente ricos en materia orgánica. Por otro lado, la modificación indirecta de los parámetros fisicoquímicos del agua (afectando la transparencia y el balance de nutrientes en agua; Cataldo, et al., 2012b) podría favorecer a productores primarios en zonas más alejadas de las colonias y a sus consumidores (como se discute en Boltovskoy, et al., 2015). En cuanto a los efectos negativos, quizás los más evidentes sean los efectos directos causados por el biofouling sobre moluscos y quizás también sobre crustáceos nativos, con consecuencias claras para su movilidad y desarrollo. Sin embargo, los efectos de alteración de hábitat que ocurre en la zona de las colonias y sus adyacencias parecen ser un mecanismo relevante por el cual *L. fortunei* afecta negativamente a los gasterópodos, dípteros y efemerópteros (Figura 5).

No obstante, debido a que estos análisis fueron realizados considerando dos muestreos diferentes, también es importante considerar otros factores que puedan tener implicancias en la variación de las abundancias de invertebrados, por ejemplo, el ciclo natural de cada grupo. En este sentido, muchos de estos organismos pueden potencialmente emerger en verano, provocando una reducción de las larvas acuáticas en los meses de mayor temperatura del agua (coincidiendo con los días en que se llevó a cabo el experimento). Por tanto, el patrón de abundancias de la fauna bentónica nativa no se puede atribuir estrictamente a la presencia de mejillones, aunque los registros puntuales, investigaciones previas y los resultados del análisis aquí expuesto sugieren que la

presencia de este invasor en los cursos de la Cuenca del Plata tendría especial relevancia en la dinámica de las comunidades de macroinvertebrados bentónicos.



**Figura 5.** Implicancias de la invasión del mejillón dorado sobre el ecosistema y principales consecuencias positivas (+) y negativas (-) sobre los invertebrados bentónicos nativos. Se indica con un número cada referencia: (1) Cataldo, et al., 2012a; (2) Sylvester, et al., 2005; (3) Sardiña, et al., 2008; (4) Boltovskoy y Correa, 2015; (5) Sylvester, et al., 2007; (6) Duchini, et al., 2018; (7) Silva, et al., 2020; (8) Mansur, et al., 2003; (9) Darrigran, et al., 1998; (10) Linares, et al., 2017.

## CONCLUSIÓN

Si bien las consecuencias económicas de la invasión del mejillón dorado son frecuentemente analizadas y cuantificadas, poco se conoce sobre el impacto ecológico del mejillón dorado en los sistemas dulceacuícolas platenses. Por ello, con este trabajo se intenta contribuir a un mejor entendimiento de dichos impactos ecológicos. En este sentido, se considera necesaria la realización de estudios que profundicen en la ecología de la invasión de este bivalvo, lo cual permitirá proponer posibles medidas de mitigación de sus principales efectos, en políticas de gestión y manejo de esta plaga.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Maite Burwood, Tatiana Vernasa, Samanta Stebniki, Clementina Calvo y Nicolás Vidal por ayudar en las campañas de muestreo. También agradecemos a los pescadores artesanales Elbio y Julio Russo, que amablemente ayudaron a cuidar los módulos experimentales desplegados en el río, y a Gonzalo Hernández-Fripp, por las obras de arte utilizadas en las figuras del manuscrito.

Este proyecto de investigación fue financiado por la Agencia Nacional de Innovación e Investigación (ANII), proyecto ANII FCE2 2016-1-126780 y la beca ANII PD\_NAC\_2015\_1\_108121. Silva recibió apoyo financiero del programa de becas de la Comisión Académica de Posgrado (CAP) y del PEDECIBA. González-Bergonzoni, Naya, D'Anatro, Clavijo, Brugnoli, Tesitore y Teixeira de Mello recibieron apoyo financiero de ANII y del PEDECIBA.

## REFERENCIAS

- Boltovskoy, D. y Correa, N., 2015. Ecosystem impacts of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei* (golden mussel) in South America. En: *Hydrobiologia*, 746, pp.81-95. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10750-014-1882-9>
- Boltovskoy, D., Karatayev, A., Burlakova, L., Cataldo, D., Karatayev, V., Sylvester, F. y Marinelarena, A., 2009. Significant ecosystem-wide effects of the swiftly spreading invasive freshwater bivalve *Limnoperna fortunei*. En: *Hydrobiologia*, 636(1), pp.271-284. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10750-009-9956-9>
- Boltovskoy, D., Xu, M. y Nakano, D., 2015. Impacts of *Limnoperna fortunei* on man-made structures and control strategies: general overview. En: Boltovskoy, D., ed. *Limnoperna fortunei: the ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel*. Cham: Springer. pp. 375-393. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-13494-9\\_21](https://doi.org/10.1007/978-3-319-13494-9_21)
- Brugnoli, E., Clemente, J., Boccardi, L., Borthagaray, A. y Scarabino, F., 2005. Golden mussel *Limnoperna fortunei* (Bivalvia, Mytilidae) distribution in the principal hydrographic basin of Uruguay: Update and prediction. En: *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 77(2), pp.235-244. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0001-37652005000200004>
- Brugnoli, E., Clemente, J., Riestra, G., Boccardi, L. y Borthagaray, A., 2006. Especies acuáticas exóticas en Uruguay: situación, problemática y gestión. En: Menafra, R., Rodríguez, L., Scarabino, F. y Conde, D., eds. *Bases para la conservación y manejo de la costa uruguaya*. Montevideo: Vida Silvestre Uruguay. pp.351-362.
- Brugnoli, E., Dabiez, M.J., Clemente, J. y Muniz, P., 2011. *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857) en el sistema de embalses del Río Negro, Uruguay. En: *Oecologia Australis*, 15, pp.576-592. DOI: [10.4257/oeco.2011.1503.10](https://doi.org/10.4257/oeco.2011.1503.10)

- Burlakova, L.E., Karatayev, A.Y. y Karatayev, V.A., 2012. Invasive mussels induce community changes by increasing habitat complexity. En: *Hydrobiologia*, 685, pp.121-134. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10750-011-0791-4>
- Cataldo, D.H., Boltovskoy, D. y Pose, M., 2003. Toxicity of chlorine and three non-oxidising molluscicides to the pest mussel *Limnoperna fortunei*. En: *Journal of the American Waterworks Association*, 95, pp.66-78. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.2003.tb10270.x>
- Cataldo, D., O'Farrell, I., Paolucci, E., Sylvester, F. y Boltovskoy, D., 2012a. Impact of the invasive golden mussel (*Limnoperna fortunei*) on phytoplankton and nutrient cycling in South America. En: *Aquatic Invasions*, 7, pp.91-100. DOI: [10.3391/ai.2011.ICAIS](https://doi.org/10.3391/ai.2011.ICAIS)
- Cataldo, D., Vinocur, A., Inés, O., Paolucci, E., Leites, V. y Boltovskoy, D., 2012b. The introduced bivalve *Limnoperna fortunei* boosts *Microcystis* growth in Salto Grande reservoir (Argentina): evidence from mesocosm experiments. En: *Hydrobiologia*, 680(1), pp.25-38. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10750-011-0897-8>
- Clemente, J., Iglesias, C., Kröger, A. y José, J., 2015. First record of the golden mussel *Limnoperna fortunei* Dunker, 1857 (Bivalvia: Mytilidae) in a lentic system in Uruguay. En: *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 10(1), pp.89-93.
- Costa, C., Ide, S. y Simonka, C.E., 2006. *Insetos imaturos: metamorfose e identificação*. Ribeirão Preto: Holos Editora.
- Crooks, J.A., 2002. Characterizing ecosystem-level consequences of biological invasions: the role of ecosystem engineers. En: *Oikos*, 97, pp.153-166.
- Cummins, K.W. y Klug, M.J., 1979. Feeding ecology of stream invertebrates. En: *Annual Review of Ecology and Systematics*, 10(1), pp.147-172.
- Darrigran, G., 2002. Potential impact of filter-feeding invaders on temperate inland freshwater environments. En: *Biological Invasions*, 4(1-2), pp.145-156. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1020521811416>
- Darrigran, G., Martin, S.M., Gullo, B. y Armendariz, L., 1998. Macroinvertebrates associated with *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia, Mytilidae) in Río de la Plata, Argentina. En: *Hydrobiologia*, 367(1-3), pp.223-230.

- de Melo Rosa, D., da Costa Gaspar, M.R., Silva, F.A. y Pompeu, P.S., 2019. Impacts of predation by piapara *Megaleporinus obtusidens* (Valenciennes, 1837) on the population densities of the invasive golden mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857). En: *Biological control*, 129, pp.158–163. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.10.012>
- Delignette-Muller, M.L. y Dutang, C., 2015. Fitdistrplus: an R package for fitting distributions. En: *Journal of Statistical Software*, 64, pp.1-34. DOI: [10.18637/jss.v064.i04](https://doi.org/10.18637/jss.v064.i04)
- Domínguez, E. y Fernández, H.R., eds., 2009. *Macroinvertebrados bentónicos sudamericanos*. Tucumán: Fundación Miguel Lillo.
- Domínguez, E., Molineri, C., Pescador, M.L., Hubbard, M.D. y Nieto, C., 2006. Ephemeroptera de América del Sur. En: Adis, J., Arais, J.R., Rueda-Delgado, G. y Wantzen, K.M., eds. *Biodiversidad acuática en América Latina*. Vol. II. Sofía: Pensoft.
- Duchini, D., Boltovskoy, D. y Sylvester, F., 2018. The invasive freshwater bivalve *Limnoperna fortunei* in South America: multiannual changes in its predation and effects on associated benthic invertebrates. En: *Hydrobiologia*, 817, pp.431-446. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10750-018-3561-8>
- Eugui, F., Clavijo, C., Röhrdanz, A., Calvo, C., Gibson, K., Plantz, A., Scarabino, F., Carranza, A., Meerhoff, M. y Burks, R., 2012. Macrofouling del mejillón dorado *Limnoperna fortunei* (Bivalvia) sobre Ampullariidae (Gastropoda) en aguas continentales del Uruguay. En: Sociedad Zoológica del Uruguay. *Libro de resúmenes del II Congreso Uruguayo de Zoología*. Montevideo: Sociedad Zoológica del Uruguay. pp.69.
- Ezcurra de Drago, I., 2004. Biodiversidad de Porifera en el Litoral Argentino. Grado de competencia con el bivalvo invasor *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia, Mytilidae). En: *Miscelánea*, 12, pp.195-204. ISSN 1514-4836 - ISSN On-Line 1668-3242
- Ezcurra de Drago, I., Montalto, I. y Oliveros, O., 2006. Desarrollo y ecología larval de *Limnoperna fortunei*. En: Darrigran, G. y Damborenea, C., eds. *Bio-invasión del mejillón dorado en el continente americano*. La Plata: Universidad Nacional de la Plata.

- Fortunato, H., 2021. Impacto ecológico do mexilhão dourado sobre a comunidade bentónica. En: *3er Workshop: Mexilhão dourado: uma ameaça ao ambiente e à sociedade. Projeto Mexilhão dourado um compromisso com o Brasil*. Brasil (19 de marzo de 2021). [s.l.]. [s.n.]
- Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E., Karatayev, V.A. y Boltovskoy, D., 2010. *Limnoperna fortunei* versus *Dreissena polymorpha*: population densities and benthic community impacts of two invasive freshwater bivalves. En: *Journal of Shellfish Research*, 29, pp.975-984. DOI: <https://doi.org/10.2983/035.029.0432>
- Linares, M.S., Callisto, M. y Marques, J.C., 2017. Invasive bivalves increase benthic communities complexity in neotropical reservoirs. En: *Ecological Indicators*, 75, pp.279-285. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.12.046>
- Logan, M., 2010. *Biostatistical design and analysis using R: a practical guide*. Chichester: Wiley-Blackwell.
- Lopes, M., Vieira, J.P. y Burns, M.D., 2009. Biofouling of the golden mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) over the Anomura crab *Aegla platensis* Schmitt, 1942. En: *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 4(2), pp.222-225.
- Mansur, M.C.D., dos Santos, C.P., Darrigran, G., Heydrich, I., Callil, C.T. y Cardoso, F.R., 2003. Primeiros dados quali-quantitativos do mexilhão-dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker), no Delta do Jacuí, no Lago Guaíba e na Laguna dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil e alguns aspectos de sua invasão no novo ambiente. En: *Revista Brasileira de Zoologia*, 20(1), pp.75-84. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-81752003000100009>
- Mansur, M.C.D., Richinitti, L.M.Z. y dos Santos, C.P., 1999. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) molusco bivalve invasor na bacia do Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. En: *Biociências*, 7(2), pp.147-149.
- Pastorino, G., Darrigran, G.A., Martin, S.M. y Lunaschi, L., 1993. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mytilidae), nuevo bivalvo invasor en aguas del Río de la Plata. En: *Neotropica*, 39, pp.34.
- Pérez, M.C., 2012. *Las incrustaciones biológicas (biofouling) y metodología para su control*. La Plata: Universidad Nacional de La Plata. (Disertación Doctoral).

- Rojas Molina, F.R. y Williner, V., 2013. First record of the non-indigenous mussel *Limnoperna fortunei* (Bivalvia, Mytilidae) as an epibiont of the crab *Trichodactylus borellianus* (Decapoda, Trichodactylidae). En: *Crustaceana*, 86(6), pp.682-692. DOI: <http://dx.doi.org/10.1163/15685403-00003183>
- Sardiña, P., Cataldo, D. y Boltovskoy, D., 2008. The effects of the invasive mussel, *Limnoperna fortunei*, on associated fauna in South American freshwaters: importance of physical structure and food supply. En: *Fundamental and Applied Limnology/Archiv fur Hydrobiologie*, 173, pp.135-144. DOI: [10.1127/1863-9135/2008/0173-0135](http://dx.doi.org/10.1127/1863-9135/2008/0173-0135)
- Scarabino, F., 2004. Conservación de la malacofauna uruguaya. En: *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay*, 8(83), pp.267-273.
- Scarabino, F. y Verde, M., 1995. *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857) en la costa uruguaya del Río de la Plata (Bivalvia; Mytilidae). En: *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay*, 7, pp.374-375.
- Silva, I., Naya, D., Teixeira de Mello, F., D'Anatro, A., Tesitore, G.; Clavijo, C. y González-Bergonzoni, I., 2020. Fish vs. aliens: predatory fish regulate populations of *Limnoperna fortunei* mitigating impacts on native macroinvertebrates communities. En: *Hydrobiología*, pp.1-21. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04421-9>
- Soutullo, A., Clavijo, C. y Martínez-Lanfranco, J.A., eds., 2013. *Especies prioritarias para la conservación en Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares*. Montevideo: SNAP, DINAMA, MVOTMA, MEC.
- Sylvester, F., Boltovskoy, D. y Cataldo, D., 2007. The invasive bivalve *Limnoperna fortunei* enhances benthic invertebrate densities in South American floodplain rivers. En: *Hydrobiologia*, 589(1), pp.15-27. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10750-007-0708-4>
- Sylvester, F., Dorado, J., Boltovskoy, D., Juarez, A. y Cataldo, D., 2005. Filtration rates of the invasive pest bivalve *Limnoperna fortunei* as a function of size and temperature. En: *Hydrobiologia*, 534, pp.71-80. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10750-004-1322-3>



Sylvester, F. y Sardiña, P., 2015. Relationships of *Limnoperna fortunei* with benthic animals. En: Boltovskoy, D., ed. *Limnoperna Fortunei. The ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel*. Cham: Springer. (Invading Nature - Springer Series in Invasion Ecology, vol. 10). pp.191-210. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-13494-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-319-13494-9_11)

Welker, M. y Walz, N., 1998. Can mussels control the plankton in rivers? a planktological approach applying a Lagrangian sampling strategy. En: *Limnology and Oceanography*, 43(5), pp.753-762. DOI: <https://doi.org/10.4319/lo.1998.43.5.0753>



## Variación anual de larvas del mejillón dorado (*Limnoperna fortunei*) en sistemas de refrigeración de centrales hidroeléctricas en embalses del Río Negro, Uruguay

Annual variation of golden mussel larvae (*Limnoperna fortunei*) in refrigeration systems of hydroelectric power plants in Río Negro reservoirs, Uruguay

Variação anual das larvas do mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) nos sistemas de refrigeração de usinas hidrelétricas em reservatórios do Río Negro, Uruguai

Daniel Fabián<sup>1, \*</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6108-1949>

Carolina Ferrer<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-0133-243X>

Jennifer Pereira<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-5170-8250>

Pablo Muniz<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-5310-3781>

Leandro Capurro<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-7651-4337>

Magdalena Mandiá<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-0262-9422>

Guillermo Failache<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0003-4174-4797>

Ernesto Brugnoli<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7304-1856>

\*Autor de contacto: [danielfabianroland@gmail.com](mailto:danielfabianroland@gmail.com)

<sup>1</sup>Oceanografía y Ecología Marina, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>2</sup>Gerencia Generación Hidráulica y Eólica, UTE, Montevideo, Uruguay

**Recepción:** 6 Setiembre 2020 **Aprobación:** 21 Mayo 2021

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional.

**Resumen:** *Limnoperna fortunei* (mejillón dorado) es un molusco invasor de la cuenca del Plata, originario del sureste asiático. Las colonias bentónicas generan macrofouling en instalaciones hidráulicas, ocasionando gastos en las empresas afectadas. El objetivo del trabajo es determinar la variación de la densidad y el tamaño de los estadios larvales valvados del mejillón dorado, estableciendo asociaciones con los parámetros de calidad de agua en sistemas de refrigeración de las tres centrales hidroeléctricas (CH) de los embalses del Río Negro (Uruguay) invadidos por la especie. En los tres sistemas de refrigeración, la densidad larval promedio del mejillón dorado presentó asociaciones con la temperatura del agua y el porcentaje de materia orgánica en agua. Se registraron las mayores densidades larvales durante los meses cálidos, y las mínimas durante los más fríos. Para los tres sistemas se sugiere un descanso reproductivo de la especie a valores menores a 18°C de temperatura del agua e inicio del ciclo larval a valores superiores. Los estadios valvados de larva Velíger tipo D y Velíger preumbonada fueron los estadios dominantes. El sistema de refrigeración de CH Constitución fue el más expuesto al asentamiento del mejillón dorado. Se destaca la necesidad de continuar profundizando en los estudios de *L. fortunei* para implementar medidas de control y mitigación de la especie.

**Palabras clave:** especie invasora acuática, incrustación biológica, molusco, manejo.

**Abstract:** *Limnoperna fortunei* (golden mussel) is an alien mollusk in the Plata basin and is native from the Southeastern Asia. Its benthic patches generate macrofouling in hydraulic installations causing additional costs to the affected companies. The objective of this work is to determine the variation of abundance and the size of the valves larval stages of the golden mussel, establishing associations with the water quality parameters in the cooling systems in the three hydroelectric power stations (HP) of the reservoirs of the Negro River (Uruguay) that has been invaded by the species. In the three cooling systems the golden mussel larval density average showed associations with temperature of the water and the percentage of organic material of the column water. Larger larval abundances were registered during warm and minimum during cold months. For the three systems, is suggested a reproductive pause of the species at water temperatures lower than 18°C and the start of the larval cycle at higher values. The Velíger larvae type D and preumbonate Veliger stages were the dominant stages. In terms of the golden mussel settlement the HP Constitución cooling system was the most exposed. It highlights the need to continue deepening in the knowledge of *L. fortunei* in order to better implement control and mitigation measures for the species.

**Keywords:** invasive aquatic species, macrofouling, mollusk, management.

**Resumo:** *Limnoperna fortunei* (mexilhão dourado) é um molusco invasor da bacia do Prata, originário do sudeste asiático. Suas colônias bentônicas geram macro incrustações (macrofouling) nas instalações hidráulicas gerando gastos adicionais nas empresas afetadas. O objetivo deste trabalho foi determinar a variação da abundância e tamanho dos estádios larvais valvados do mexilhão dourado, estabelecendo possíveis associações com variáveis de qualidade da água nos sistemas de refrigeração em três usinas hidrelétricas (CH) dos reservatórios invadidos do Río Negro (Uruguai). Nos três sistemas de refrigeração as médias dos estádios larvais do mexilhão dourado apresentaram associações com a temperatura da água e a porcentagem de matéria orgânica. Foram registradas maiores abundâncias larvais nos meses mais cálidos e menores nos mais frios. Para os três sistemas, sugere-se um repouso

reproductivo da espécie em valores inferiores a 18°C de temperatura da água e o início do ciclo larval em valores superiores. Os estádios valvados de larva Velíger tipo D e Velíger préumbonada fôramos dominantes. Em termos de assentamento de mexilhões o sistema CH Constitución foi o mais exposto. Destaca-se a necessidade de continuar gerando conhecimento sobre essa espécie invasora de forma tal que as medidas que se adotem para programar o controle e a mitigação da espécie tenham maior sustento científico-técnico.

**Palavras-chave:** espécie invasora aquática, incrustação biológica, molusco, gestão.

## INTRODUCCIÓN

*Limnoperna fortunei* (Dunker 1857), conocido como mejillón dorado, es una especie de molusco invasor de la cuenca del Plata, originaria de sistemas de agua dulce del sudeste asiático (Darrigran, 2002). En Uruguay se registró por primera vez en 1994 en zonas costeras del Río de la Plata (Scarabino y Verde, 1995), presentando actualmente una amplia distribución en las cuencas del Río de la Plata, Río Negro, Río Uruguay, Río Santa Lucía, Laguna Merín (Brugnoli, et al., 2005; Langone, 2005) y más recientemente en Laguna del Sauce (Clemente, et al., 2015). Desde su llegada a la región ha colonizado diversos tipos de sustratos consolidados (naturales y artificiales), y ha presentado un aumento en su abundancia poblacional y cambios en la composición de la comunidad bentónica y dietas de peces autóctonos de la cuenca del Plata. Adicionalmente, causa incrustaciones (*macrofouling*), ocasionando daños en instalaciones hidráulicas (Darrigran, et al., 1998; Darrigran y Ezcurra de Drago, 2000; Montalto, et al., 1999; Penchaszadeh, et al., 2000; Mansur, et al., 2003; Brugnoli, et al., 2005; Boltovskoy y Correa, 2015).

Durante su ciclo biológico, presenta diversos estadios larvales y posteriormente desarrolla estructuras para la fijación. La etapa de asentamiento ocurre en los últimos estadios larvales con organismos que presentan tamaños entre 500-800µm (Ezcurra de Drago, et al., 2006). Este tamaño de organismo no presenta barreras físicas en los diferentes sistemas de conducción hidráulica debido a que la mayoría de los sistemas de captación consideran sistemas de filtración o rejillas con tamaños de poro mayores a 1000µm. De esta manera, las larvas y estadios con estructuras de fijación (filamentos bisales) ingresan, se asientan y desarrollan colonias bentónicas en el interior de los sistemas de conducción hidráulica, o en diferentes estructuras humanas (Darrigran, 2002; Darrigran, et al., 2007; Boltovskoy, 2015). Las colonias bentónicas asentadas ocasionan *macrofouling*, afectando los servicios ecosistémicos de los recursos hídricos de la cuenca del Plata (Brugnoli, et al., 2006; Darrigran, et al., 2007; Boltovskoy y Correa 2015). Entre los servicios ecosistémicos afectados, destacan usos del agua con fines energéticos, potabilización, riego, refrigeración o para uso agroindustrial (Darrigran, 2002; Boltovskoy, 2015). El mejillón dorado ha ocasionado obstrucción de filtros, inutilización de sensores hidráulicos, daños en las bombas de captación y disminución del diámetro de tuberías de conducción del agua. Estos efectos generan gastos en

plantas potabilizadoras de agua, centrales nucleares, hidroeléctricas, refinerías, siderúrgicas y plantas agroindustriales (acuicultura, forestal, alimenticia), debido a tareas de mantenimiento y modificaciones estructurales, así como en planes de manejo y control poblacional de la especie (Muniz, et al., 2005; Brugnoli, et al., 2006; Boltovskoy, 2015).

El ciclo larval de la especie es muy flexible dado que se adapta a amplias variaciones ambientales (Damborenea y Penchaszadeh, 2006). La temperatura es una característica ambiental importante, que se acompaña de otras, como el fotoperíodo y la abundancia de fitoplancton, las cuales en conjunto favorecen el desove (Haag, et al., 1992; Ram, et al., 1996; Darrigran, et al., 2007). Entre los parámetros ambientales involucrados en su etapa larval, la densidad de los estadios larvales está relacionada con la temperatura del agua, dado que la actividad reproductiva de *L. fortunei* se ve interrumpida con valores menores a 16-17°C (Cataldo y Boltovskoy, 2000).

En el Río Negro se ubican tres embalses en cadena destinados mayormente a la generación de energía hidroeléctrica (Conde y Sommaruga, 1999). Estos ambientes se encuentran en una zona templada, apropiada para las larvas del mejillón dorado, donde la temperatura, pH y conductividad se encuentran dentro del rango adecuado de sobrevivencia de la especie (Darrigran y Damborenea, 2005; Darrigran, et al., 2007; Chalar, et al., 2012; Chalar, et al., 2015). En este sistema de embalses se registra la presencia de larvas y estadios bentónicos de *L. fortunei* desde 1999, mostrando un avance de la invasión en dirección río arriba (embalse Palmar hacia embalse del Rincón del Bonete) (Brugnoli, et al., 2005; Brugnoli, et al., 2011). Esta especie invadió los cuerpos de agua y el interior de las centrales hidroeléctricas, colonizando los sistemas de refrigeración de las turbinas, sensores hidráulicos, tuberías, cámaras y estructuras sumergidas (Clemente y Brugnoli, 2002; Brugnoli, et al., 2011).

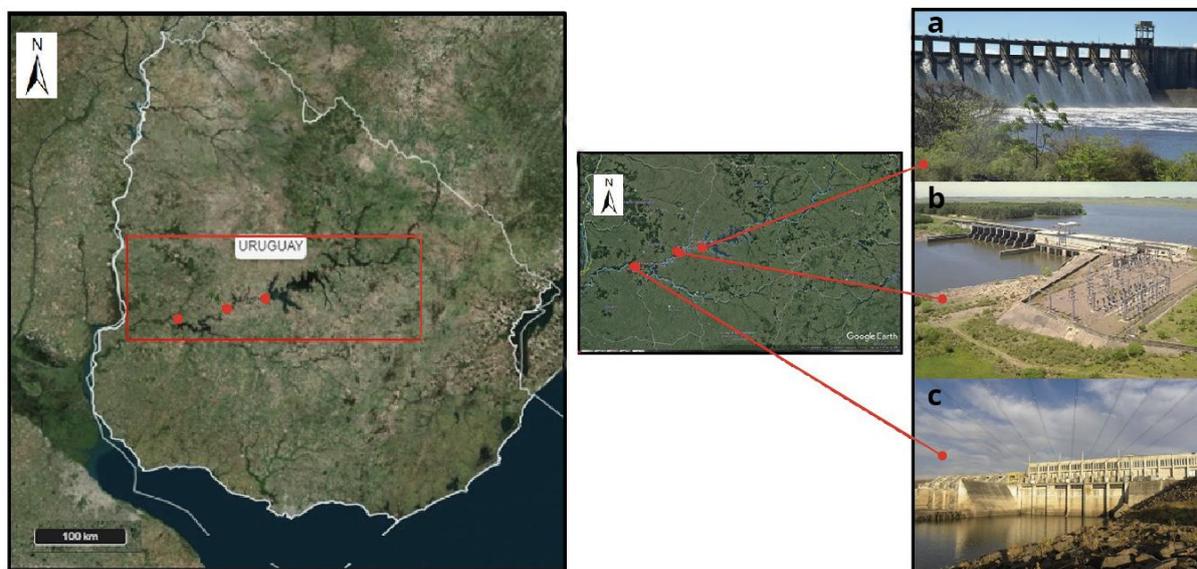
El objetivo del presente trabajo es describir la variación anual (2018-2019) en la densidad y el tamaño de los estadios larvales valvados de *L. fortunei* y su relación con variables fisicoquímicas del agua en los sistemas de refrigeración de tres centrales hidroeléctricas (Rincón del Bonete, Baygorria y Constitución), generando recomendaciones de manejo para mitigar la problemática del mejillón dorado en las mencionadas CH del Río Negro.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio

El Río Negro es el principal río interior de Uruguay, presenta una cuenca de 72000 km<sup>2</sup>, de los cuales 68875 km<sup>2</sup> se encuentran en territorio uruguayo. Este río presenta un sistema de embalses (E-W): Rincón del Bonete (1070 km<sup>2</sup>), Baygorria (100 km<sup>2</sup>) y Palmar (320 km<sup>2</sup>), destinados a la producción de energía eléctrica, con una capacidad

de generación de 600 MW (Conde y Sommaruga, 1999) (Figura 1). La CH Rincón del Bonete (situada en el embalse Rincón del Bonete) fue instalada en 1948, con una potencia de 155 MW (4 turbinas); la CH Baygorria fue puesta en funcionamiento en 1960 y presenta 108 MW (3 turbinas), mientras que la CH Constitución (embalse Palmar) comenzó a funcionar en 1982, con una potencia instalada de 333 MW (3 turbinas).



**Figura 1.** Área de estudio. a) CH Rincón del Bonete, b) CH Baygorria y c) CH Constitución.

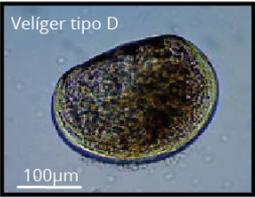
### Estrategia de muestreo

En los tres sistemas de refrigeración (SR) de las CH Rincón del Bonete, Baygorria y Constitución se escogió una turbina por CH para su monitoreo. La colecta de muestras de agua en los SR se realizó por técnicos de UTE previamente capacitados entre febrero de 2018 y febrero de 2019. Presentó una periodicidad de colecta quincenal durante los meses de primavera, verano e inicios de otoño (setiembre-abril), y mensual en otoño e invierno (mayo-agosto). Las muestras cuantitativas (larvas de *L. fortunei*) se colectaron por triplicado en los diferentes SR, filtrando 100L de agua con una malla de 100 $\mu$ m y se fijaron *in situ* en alcohol (95%). Complementariamente, en un punto de los SR se colectaron 5L de agua para la determinación de variables fisicoquímicas (pH, conductividad, sólidos suspendidos totales, materia orgánica en suspensión y % materia orgánica). Las muestras fueron enviadas a Montevideo para su análisis en los laboratorios de Oceanografía y Ecología Marina (Facultad de Ciencias, UdelaR). Los registros continuos de temperatura del agua se obtuvieron a partir de sensores automáticos ubicados al ingreso de los SR y fueron facilitados por las gerencias de las diferentes CH.

## Análisis de laboratorio

Una vez arribadas las muestras al laboratorio (24 horas de colectadas), se determinó la conductividad mediante un multiparámetro YSI 63, y el pH mediante pH-metro EcoTester pH2. Para las concentraciones de sólidos totales en suspensión (SST), materia orgánica en suspensión y porcentaje de materia orgánica (MO y %MO), se filtraron 1000mL por muestra en un filtro de 0,45µm, se secaron (60°C) y muflaron (500°C), de acuerdo con Arocena (2016). La cuantificación de larvas de *L. fortunei* (densidad promedio total y densidad por estadio larval) se realizó en un microscopio óptico binocular a 10 y 40 aumentos, utilizando una cámara Sedwick-Rafter de 2mL, realizándose el conteo total de la muestra. La densidad se expresa en ind.m<sup>-3</sup>. Para la separación de los estadios se utilizó una serie de tamices de 1,2mm, 0,8mm, 0,5mm, 0,15mm y 0,10mm de apertura de malla. Los estadios valvares considerados se identificaron de acuerdo con Ezcurra de Drago y otros (2006) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Características de los estadios larvales valvados analizados (modificado de Ezcurra de Drago, et al., 2006).

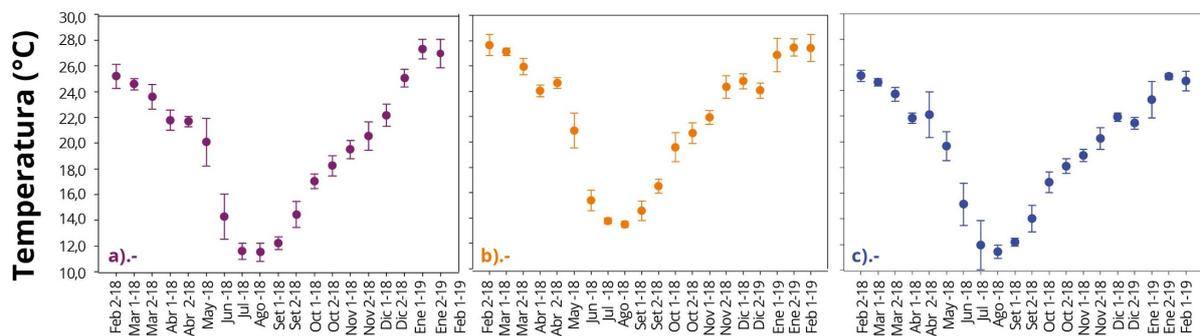
| Tipo de larva   |                          | Características  |
|---|--------------------------|--|
|    | Velíger tipo D           | Forma D, desarrollo completo del velo.<br>Tamaño aprox.120µm                         |
|    | Velíger preumbonada      | Comienzo de formación del umbón,<br>líneas de crecimiento.<br>Tamaño aprox.150µm.    |
|    | Velíger umbonada         | Mayor desarrollo del umbo.<br>Tamaño aprox. 200µm                                    |
|    | Pedivelíger              | Formación de pie, visualización<br>de filamentos branquiales.<br>Tamaño aprox.230µm. |
|  | Plantígrada o Post-larva | Ausencia de velo, forma similar<br>al adulto. Tamaño aprox. 750µm                    |

## Análisis de datos

En las diferentes CH se determinaron los promedios y desvíos quincenales/mensuales de temperatura, conductividad, pH, SST, MO y %MO. La conductividad (K), los SST y el %MO se transformaron mediante  $\log(x+1)$ , según lo establecido por Reavie y otros (2010); para la densidad promedio larval se utilizó raíz cuarta (Xu, et al., 2011); mientras que el pH y la temperatura no fueron transformados. Se realizaron correlaciones de Pearson entre las variables fisicoquímicas y la densidad promedio larval, considerando un nivel de significancia del 99 y 95%. Se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) para identificar las asociaciones entre los parámetros ambientales y los promedios de densidades larvales, considerando las tres CH durante los diferentes muestreos. Para ambos análisis estadísticos no se consideró la MO. El ACP y las correlaciones se realizaron con el Software *R* utilizando los paquetes *ggfortify* y *ggplot2*.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La variación anual de la temperatura del agua en los sistemas de refrigeración para las tres CH presentó tendencias similares; valores máximos en verano (diciembre-febrero), una disminución a partir de marzo y valores mínimos en invierno (julio-agosto) (Figura 2). A pesar de las tendencias similares, la CH Baygorria mostró períodos de temperatura mínimos y máximos más prolongados en el tiempo, en comparación con las CH Rincón del Bonete y Constitución.



**Figura 2.** Promedios mensuales ( $\bar{x} \pm ds$ ) de temperatura del agua en las tres CH: a) Rincón del Bonete b) Baygorria y c) Constitución, durante el período de estudio. Mes 1: primera quincena, Mes 2: segunda quincena; 18 y 19: años de colecta.

El pH presentó valores alcalinos en el 96% de los casos; los mínimos registrados fueron similares en las tres CH (6,84 Baygorria, 7,40 Rincón del Bonete y 6,81 Constitución). Los máximos se presentaron en Rincón del Bonete (8,85), Baygorria

(8,90) y Constitución (9,1). La conductividad osciló entre  $64,4\mu\text{Scm}^{-1}$  y  $203,1\mu\text{Scm}^{-1}$ , los mínimos se observaron en la CH Rincón del Bonete (octubre 2018) y los máximos en la CH Baygorria (noviembre 2018). La mayor concentración de sólidos suspendidos totales (SST) se encontró en la CH Baygorria, en febrero ( $18,8\text{mgL}^{-1}$ ), y la concentración máxima de MO en la CH Rincón del Bonete, en abril ( $5\text{mgL}^{-1}$ ). Los %MO mostraron un comportamiento similar en las tres CH, con máximos durante verano (CH Baygorria, febrero) y mínimos durante el invierno (CH Constitución, julio) (Tabla 2). Las tendencias de los parámetros fisicoquímicos en los sistemas de refrigeración de las tres CH situadas en el Río Negro se ajustan con los encontrados en monitoreos de calidad de agua realizados en los embalses de dicho sistema fluvial (Chalar, et al., 2015).

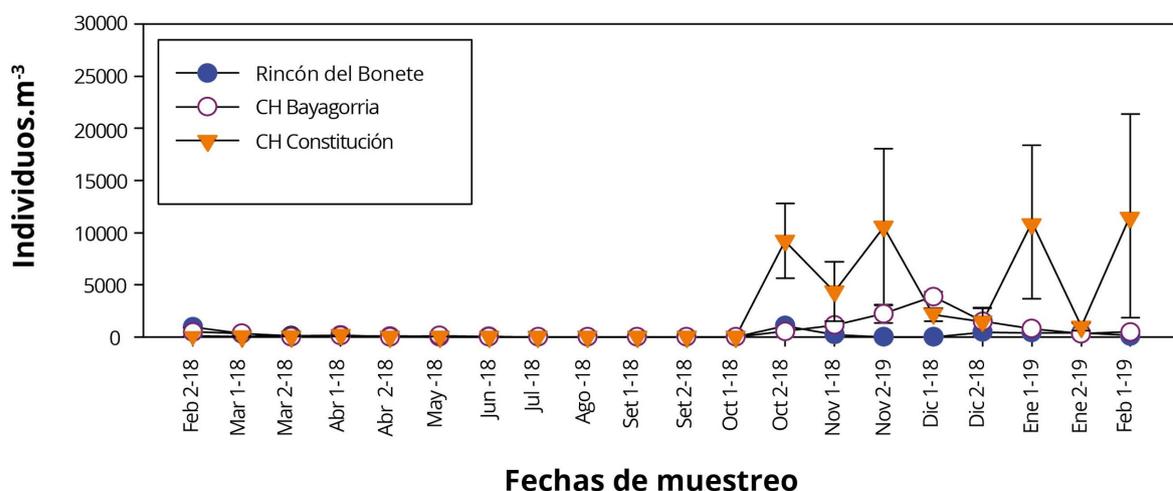
**Tabla 2.** Variables fisicoquímicas del agua. Promedios ( $\bar{x}$ ), coeficiente de variación (CV), máximos y mínimos. Abreviaciones: K: conductividad, SST: sólidos suspendidos totales, MO: materia orgánica. Mes 1: primera quincena, Mes 2: segunda quincena; 18 y 19: años de colecta.

|                           |                   | $\bar{x} \pm \text{CV}$ | Máximo | Mes      | Mínimo | Mes      |
|---------------------------|-------------------|-------------------------|--------|----------|--------|----------|
| pH                        | Rincón del Bonete | $8,11 \pm 0,06$         | 8,85   | Abr 1-18 | 7,4    | Set 2-18 |
|                           | Baygorria         | $8,04 \pm 0,07$         | 8,9    | Dic 2-18 | 6,84   | Ene 2-19 |
|                           | Constitución      | $8,04 \pm 0,07$         | 9,1    | Ago 2-18 | 6,81   | Ene 2-19 |
| K<br>$\mu\text{Scm}^{-1}$ | Rincón del Bonete | $84,70 \pm 0,32$        | 178,70 | May 2-18 | 64,40  | Oct 2-18 |
|                           | Baygorria         | $88,18 \pm 0,33$        | 203,10 | Nov 2-18 | 65,50  | Oct 2-18 |
|                           | Constitución      | $90,64 \pm 0,14$        | 113,90 | Jun 2-18 | 76,00  | Nov 1-18 |
| SST<br>$\text{mgL}^{-1}$  | Rincón del Bonete | $7,39 \pm 0,49$         | 16,60  | May 2-18 | 3,38   | Ene 2-19 |
|                           | Baygorria         | $9,92 \pm 0,41$         | 18,80  | Feb 1-18 | 1,60   | Feb 1-19 |
|                           | Constitución      | $8,23 \pm 0,40$         | 16,22  | Ago 2-18 | 2,67   | Feb 1-19 |
| MO<br>$\text{mgL}^{-1}$   | Rincón del Bonete | $1,76 \pm 0,56$         | 5,00   | Abr 2-18 | 0,80   | Oct 2-18 |
|                           | Baygorria         | $1,88 \pm 0,39$         | 3,71   | Dic 2-18 | 0,80   | Feb 1-19 |
|                           | Constitución      | $1,56 \pm 0,27$         | 2,70   | Mar 1-18 | 1,10   | Oct 1-18 |
| %MO                       | Rincón del Bonete | $25,66 \pm 0,39$        | 46,00  | Dic 2-18 | 10,53  | Set 1-18 |
|                           | Baygorria         | $21,35 \pm 0,47$        | 50,00  | Feb 1-19 | 11,28  | Jun 2-18 |
|                           | Constitución      | $21,75 \pm 0,45$        | 47,22  | Ene 1-19 | 9,70   | Jul 2-18 |

En los tres sistemas de refrigeración (SR), la variación anual de la densidad de larvas de *L. fortunei* mostró comportamientos similares (Figura 3). Por otro lado, se observa una importante variabilidad en cada uno de los tres sistemas de refrigeración, reflejado en los desvíos estándar. Esta variabilidad podría estar explicada por la hidrodinámica en los diferentes sistemas de refrigeración de las tres CH (caudal, velocidad, tiempo de residencia, número de condensadores).

Las máximas densidades larvales se encontraron al inicio de la primavera y mediados del verano, con valores mínimos durante invierno. La CH Constitución presentó la densidad máxima (11603ind.m<sup>-3</sup>) durante febrero de 2019, donde la densidad larval promedio superó los 6000ind.m<sup>-3</sup> a partir de fines octubre, manteniéndose hasta febrero. La CH Baygorria superó los 1000ind.m<sup>-3</sup>, mientras que Rincón del Bonete no alcanzó los 500ind.m<sup>-3</sup>.

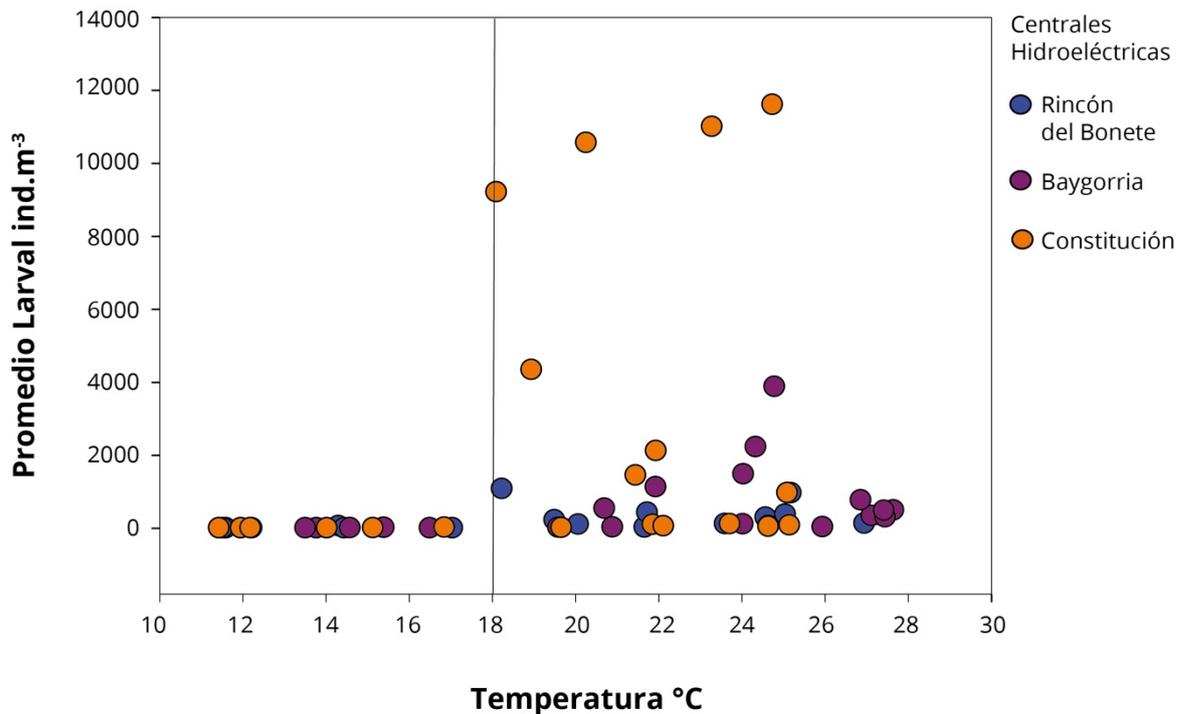
La temperatura promedio de los tres SR mostró una correlación significativa positiva con el promedio de larvas ( $r=0,63$ ;  $n=54$ ;  $p<0.001$ ). Por otro lado, el incremento de la densidad larval en las tres CH se observó a partir de la segunda quincena de octubre 2018, cuando la temperatura del agua de los SR es mayor a 18°C (Figuras 2 y 3). La temperatura del agua es uno de los factores ambientales asociados al ciclo larval de *L. fortunei*, según diversos autores (Damborenea y Penchaszadeh, 2006; Darrigran, et al., 2007; Boltovskoy, et al., 2013; Giglio, et al., 2016). Dichos autores relacionan la presencia de larvas de la especie con temperaturas superiores a los 18°C, coincidiendo con los resultados encontrados en el presente estudio.



**Figura 3.** Variación de la densidad promedio ( $\pm$  ds) larval de *Limnoperna fortunei* en las tres CH durante 2018-2019.

En las tres CH se observó un incremento en la densidad larval a partir de la segunda quincena de octubre de 2018, que se corresponde con temperaturas del agua mayores a 18°C (Figuras 3 y 4). Los resultados coinciden con Brugnoli y otros (2011) en estudios realizados en el embalse Palmar (Río Negro). En los mismos se encontró un comportamiento estacional de larvas de *L. fortunei* con máximos durante la primavera y los inicios del otoño, y ausencia durante invierno, sugiriendo una reproducción continua de la especie entre agosto y abril. Los resultados del presente trabajo sugieren la presencia de un descanso reproductivo de la especie durante épocas de temperatura del agua menor a 18°C, en los embalses del Río Negro.

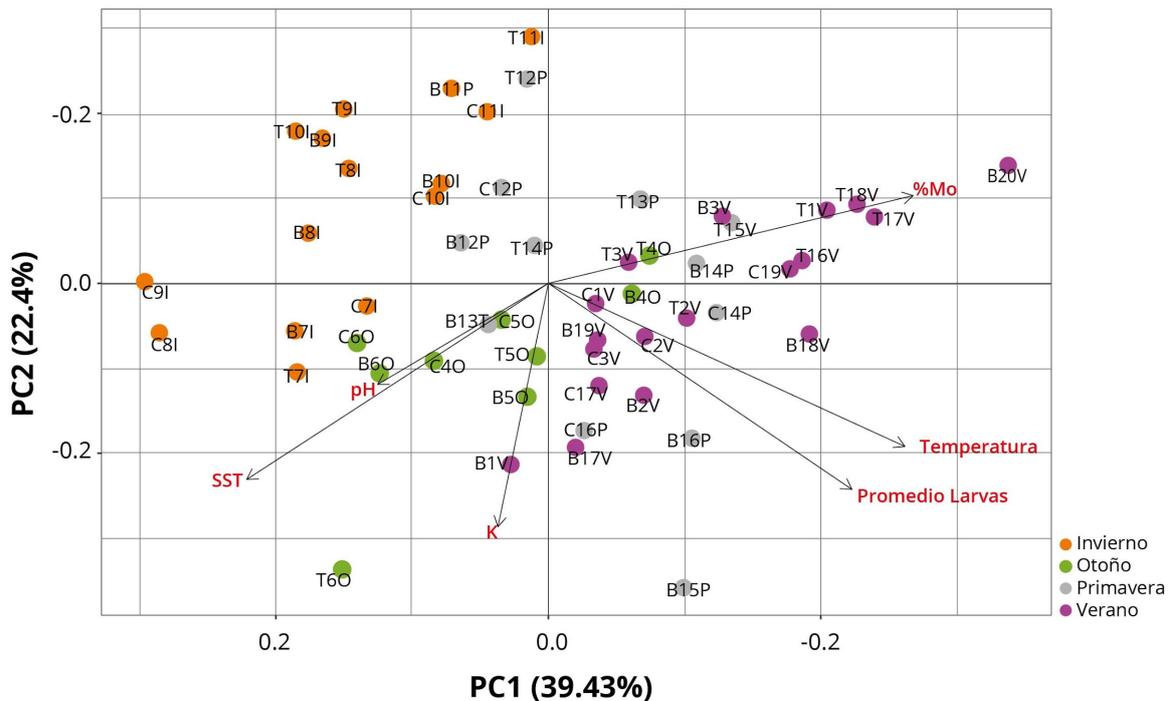
Por otro lado, las CH presentaron diferencias en las densidades promedio de larvas (Constitución > Baygorria > Rincón del Bonete), con hasta un orden de magnitud mayor en la CH Constitución durante los máximos larvales (Figuras 3 y 4). Estudios realizados en los embalses de las correspondientes CH evidenciaron que, durante el período 2000-2015, las biomásas de larvas de *L. fortunei* mostraron similares patrones que los observados en el presente trabajo. El embalse Palmar posee la mayor biomasa de larvas, seguido por Baygorria y Rincón del Bonete (Chalar, et al., 2010 y 2015). Este comportamiento podría asociarse a las características particulares de los embalses (por ejemplo, caudal, tiempos de residencia, disponibilidad de alimento, concentración de sólidos suspendidos totales o disponibilidad de sustratos consolidados), a las abundancias de organismos bentónicos, o al comportamiento biológico de las poblaciones del mejillón dorado (por ejemplo, potencial biótico, disponibilidad larval). Darrigran y otros (2007) afirman que, a pesar de que la temperatura es un factor condicionante, son necesarias otras variables para la liberación de larvas, como por ejemplo la disponibilidad de alimento.



**Figura 4.** Temperatura del agua y densidad promedio larval de *L. fortunei* en las tres CH del Río Negro.

La densidad promedio de larvas no presentó correlaciones significativas con el pH, SST y K; sin embargo, presentó asociaciones significativas con el %MO ( $r=0,34$ ;  $n=54$ ;  $p<0,05$ ). El %MO expresa la disponibilidad del alimento presente en el agua, siendo la fracción disponible para el consumo de adultos y larvas de *L. fortunei*. Las densidades larvales en la CH Baygorria presentaron un máximo (diciembre), mientras que en Constitución se identificaron cuatro máximos (octubre, noviembre, enero y febrero) (Figura 4). La CH Rincón del Bonete presentó promedios larvales bajos en comparación con los otros embalses, con un máximo en octubre. Chalar y otros (2011 y 2015) encontraron en estos embalses máximos larvales durante los mismos meses que el presente estudio. Estos máximos larvales están determinados por los ciclos gonadales de los individuos junto a otras características ambientales del sistema (por ejemplo, el tiempo de residencia de los embalses, las características de los SR de las diferentes CH, la disponibilidad de oxígeno o el alimento) (Darrigran, et al., 2007, Giglio, et al., 2016; Ernandes-Silva, et al., 2017). La presencia de máximos de densidad larval en sitios donde la especie posee reproducción prolongada ha sido reportada para el alto Paraná (Brasil). En dicha zona, *L. fortunei* presenta reproducción durante todo el año, donde los máximos larvales se observaron entre diciembre y febrero, coincidiendo con épocas de mayor temperatura y disponibilidad de alimento (Ernandes-Silva, et al., 2017). Estos resultados concuerdan con los encontrados durante el presente estudio.

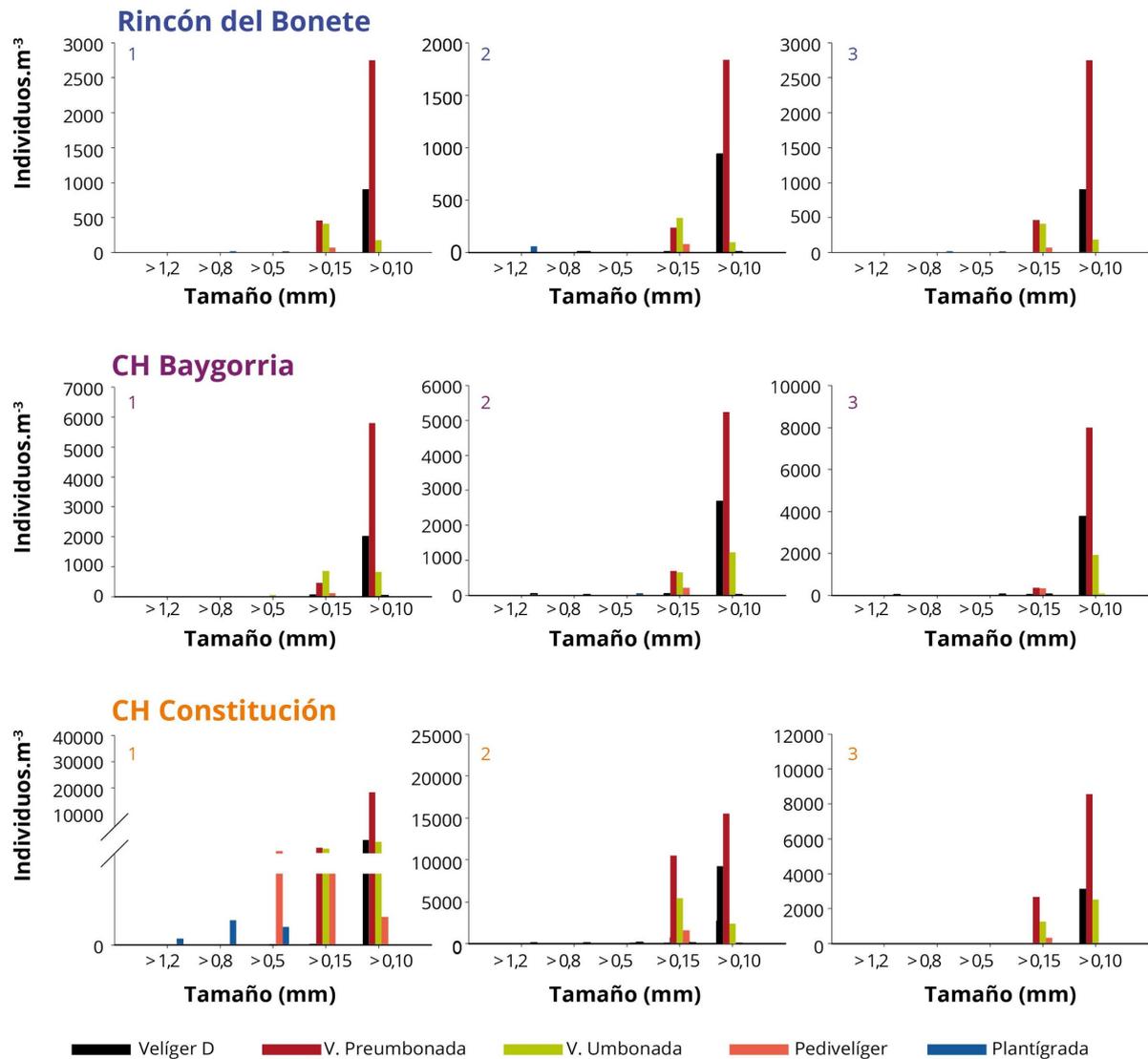
El resultado del ACP (Figura 5) indicó que los dos primeros ejes explican el 62% de la varianza total de los datos. El primer factor explica el 39,4% de la varianza y se puede asociar con los meses de mayor temperatura del agua, en donde las variables de mayor peso correspondieron a la temperatura, al promedio larval y al %MO en agua, con la presencia de un patrón estacional. Por otro lado, el segundo componente explica el 22,4% de la varianza, asociado negativamente con K, SST y pH, aunque no se observa un patrón estacional claro con estas variables. Los meses que se relacionan positivamente con el primer eje corresponden a los meses de verano y primavera, caracterizado por presentar una mayor temperatura del agua y disponibilidad de alimento debido a las floraciones algales reportadas en el embalse (Chalar, et al., 2015). La temperatura y disponibilidad de alimento son factores asociados al aumento de las densidades larvales de *L. fortunei* en diferentes estudios (Darrigran, et al., 2007; Boltovskoy et al., 2009). En el presente estudio se considera el %MO como un indicador de calidad del alimento, debido a que representa la fracción de los SST que pueden ser asimilados por la especie. El ACP (Figura 5) indica que el %MO y los SST poseen una correlación negativa, lo que implicaría que el aumento de los SST se produciría por partículas inorgánicas, donde las densidades larvales estarían negativamente afectadas por los mismos. Las elevadas cargas de SST inorgánicos afectan a esta especie debido a que son organismos filtradores tanto en estadios larvales como adultos, ocasionando reducción en el área branquial en adultos; lo cual podría dificultar la obtención de alimento y oxígeno, además de aumentar la superficie de los palpos labiales, los cuales son órganos encargados de seleccionar el alimento. Debido a esto se perdería más energía seleccionando las partículas palatables (Paolucci, et al., 2014; Paolucci, 2021). Complementariamente, los SST reducen la penetración de la luz, afectando negativamente al fitoplancton como fuente de alimento para la especie, pudiendo generar reducción del oxígeno disuelto que se ha sugerido como una limitante para el establecimiento de la especie (Dodds y Whiles, 2010; Paolucci, 2021). Por lo anterior, los SST con bajo %MO podrían disminuir la liberación de gametas o generar mortandad larval debido a que son alimentos de baja calidad. De esta manera, el ciclo larval estaría más condicionado por la temperatura del agua, y posiblemente por la calidad del alimento, que por el sitio de colecta (CH). A pesar de estos resultados, existirían otros factores que podrían aportar a la dinámica larval y que no están siendo registrados en el ACP, como pueden ser las poblaciones de adultos en los embalses y sus afluentes, los caudales, el tipo de fitoplancton o la presencia de cianotoxinas (Boltovskoy, et al., 2009).



**Figura 5.** Diagrama de ordenación del Análisis de Componentes Principales para las tres CH durante 2018-2019. Variables ambientales y bióticas (flechas negras). CH: T: Rincón del Bonete, B: Baygorria, C: Constitución; número de muestreo (1-20) y estaciones del año: I: Invierno, O: Otoño, P: Primavera, V: Verano.

En otros sistemas acuáticos de la cuenca del Plata se ha sugerido que la aparición de *L. fortunei* estaría asociada al aumento de floraciones de cianobacterias potencialmente tóxicas del género *Microcystis* (Boltovskoy, et al., 2013). Dicha especie es capaz de filtrar selectivamente sobre el fitoplancton de pequeño tamaño y de poca movilidad, generando una disminución de la competencia para *Microcystis* spp. Esta especie de cianobacteria tiene la capacidad de formar colonias y regular su flotabilidad, no siendo fuertemente afectadas por la filtración del mejillón dorado (Gazulha, et al., 2012; Boltovskoy, et al., 2013; Silva y Giani, 2018). Boltovskoy y otros (2009 y 2013) describieron que altas concentraciones de Microcistinas L-R son capaces de matar las larvas de *L. fortunei*. Por otro lado, en los embalses del Río Negro, Chalar y otros (2015) observaron que durante los meses de verano ocurren las mayores concentraciones de toxinas, siendo este un factor que podría estar influyendo en las densidades larvales.

En los SR de las tres CH, los estadios valvados dominantes fueron Velíger tipo D y Velíger preumbonada (Figura 6). Las densidades de los diferentes estadios larvales presentaron correlaciones con la temperatura del agua y el %MO, aunque con diferencias entre ellos (Tabla 3).



**Figura 6.** Densidad total (suma período febrero 2018-febrero 2019) de los estadios valvados de *Limnoperna fortunei* por tamaño en los sitios de muestreo (1-3) de los SR de las CH Rincón del Bonete, Baygorria y Constitución.

**Tabla 3.** Correlaciones entre las densidades de los estadios larvales en las CH con temperatura del agua y porcentaje de materia orgánica. R y p-valor (\*95% y \*\* 99%). NS=No Significativo.

| Estadio Larval      | Temperatura | % MO      |
|---------------------|-------------|-----------|
| Velíger tipo D      | 0,72**      | 0,34*     |
| Velíger preumbonada | 0,69**      | 0,34*     |
| Velíger umbonada    | 0,47*       | 0,28*     |
| Pedivelíger         | 0,38*       | 0,18 (NS) |
| Plantígradas        | 0,42*       | 0,00 (NS) |

El tamaño dominante de larvas correspondió a organismos mayores a 100µm, seguido de mayores a 150µm. Los restantes tamaños (500, 800 y 1200µm) presentaron baja representación (Figura 6). El estadio de Velíger umbonada, Pedivelíger y Plantígrada (o Post-larvas) (tamaños que aproximadamente oscilan entre 200 y 800µm) ocurrieron pocas veces y en pocos lugares (Figura 6). Sin embargo, en CH Constitución se registró una mayor cantidad de Plantígrada o Post-larva, principalmente en el sitio 1.

El primer estadio valvado de *L. fortunei* (Velíger tipo D) presenta tamaños entre 100 y 175µm (Cataldo, et al., 2005; dos Santos, et al., 2005). El tamaño de mallas consideradas en el presente trabajo (100µm) pudo haber generado un sesgo en las densidades larvales determinadas debido a una posible pérdida de individuos de menor tamaño de este estadio. A pesar de estas posibles limitaciones metodológicas, las mayores densidades de larvas correspondieron al estadio Velíger tipo D. Estas larvas provienen de los embalses de las mismas CH, debido a que por los tiempos de residencia y la temperatura del agua no poseerían el tiempo necesario para alcanzar estadios más avanzados (Cataldo, 2015).

Los estadios más avanzados (Velíger preumbonada y Velíger umbonada) provienen de aguas arriba, posiblemente de los otros embalses, en el caso de Baygorria y Constitución. Sin embargo, en los tramos de río entre los mismos se genera una mortandad natural de las larvas, siendo que se ha registrado entre un 80 y 90% de mortandad de larvas entre el estadio Velíger preumbonada y Velíger umbonada en estudios de laboratorio y por depredación (Boltovskoy y Correa 2015; Cataldo, 2015). Adicionalmente, a medida que avanzan en su desarrollo comienzan a asentarse, haciendo que estén menos presentes en la columna de agua (Cataldo, 2015). Las altas mortandades previas del estadio Velíger umbonada explican por qué existe un declive

tan drástico entre estos dos estadios. En Constitución se reportaron las máximas densidades, los mayores tamaños y la mayor variedad de estadios. Los estadios de mayor tamaño (estadio Plantígrado o Post-larva) se encuentran cercanos a su fase de asentamiento bentónico, siendo entonces el SR de la CH Constitución el más expuesto al asentamiento del mejillón dorado.

## CONCLUSIONES

En los tres sistemas de refrigeración analizados, la densidad promedio y la densidad de los diferentes estadios larvales del mejillón dorado presentaron asociaciones con la temperatura del agua y el porcentaje de materia orgánica. Ambas variables han sido consideradas en otros estudios como variables que promueven la presencia de estadios larvales en sistemas naturales o artificiales invadidos por *L. fortunei*.

En los tres sistemas, a valores menores de 18°C en la temperatura del agua, la especie mostró un descanso reproductivo; y a valores superiores, el inicio del ciclo larval. El porcentaje de materia orgánica estaría relacionado con la disponibilidad de alimento en el sistema de embalses. En futuros estudios, esta variable debería considerarse un parámetro a analizar como promotora de un incremento en las densidades larvales, así como condicionante en la supervivencia de larvas y adultos.

Los estadios Velíger tipo D y Velíger preumbonada fueron los dominantes en las tres centrales hidroeléctricas. El tamaño dominante fue mayor a 100µm, seguido por tamaños mayores a 150µm, donde los estadios valvados de Post-larva se registraron principalmente en la CH Constitución, siendo el más expuesto al asentamiento y posterior *macrofouling*. Para lograr una mejor aproximación a la dinámica larval de los estadios larvales valvados de *L. fortunei* se recomienda utilizar para su colecta tamaños de malla más pequeños (<100µm); realizar monitoreos con una mayor periodicidad de colecta (semanal o diaria) principalmente durante épocas de mayor temperatura del agua, considerando simultáneamente sistemas hidráulicos (por ejemplo, sistemas de refrigeración) y ecosistemas acuáticos (por ejemplo, embalses, ríos).

En relación con el manejo, de acuerdo con el ciclo anual larval del mejillón dorado observado, la aplicación de métodos o estrategias de control en estos sistemas hidráulicos de las CH del Río Negro deberían focalizarse durante meses con mayor temperatura del agua y disponibilidad de alimento. Durante la primavera (setiembre-octubre) y el verano, las acciones de manejo deberían presentar la máxima intensidad, disminuyendo durante el otoño (a partir de mayo) y cesando en invierno (junio-agosto).

Se recomienda continuar los estudios poblacionales de *L. fortunei* considerando estadios larvales (no valvados y valvados), así como estadios bentónicos en sistemas artificiales (CH) y embalses en simultáneo. Estos estudios profundizarán la generación

de conocimiento para la implementación de medidas de control y mitigación de la especie.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue generado en el marco del Programa de Vinculación Universidad–Sociedad y Producción, CSIC-Udelar, Convenio Facultad de Ciencias– UTE “*Limnoperna fortunei* (mejillón dorado) en las presas y embalses del Río Negro, grado de invasión y aplicación de métodos de control mecánico”. Fue presentado en el Simposio de “Ecología y Manejo del molusco invasor *Limnoperna fortunei* (mejillón dorado) en Uruguay”, realizado en diciembre 2019 en Montevideo. Se agradece a la empresa UTE por su financiamiento y por el apoyo del personal, especialmente a la Gerencia de Planificación del Abastecimiento: Ing. Daniel Tasende, Cra. María del Rosario López, Cra. Leticia Severi, Ing. Alfonso Ruiz. En la Gerencia de Generación Hidráulica (Montevideo), Ing. Federico Sosa, así como en las Centrales Hidroeléctricas; CH Constitución: Ing. Gustavo Areco, Ing. Juan Deferrari, Alejandro Montaña, Kidia Perez, Gustavo Larrosa, Andrés Calvo, Luis Pombo, Luciano Alderete, David Ruiz, María Eugenia González; CH Baygorria: Ing. José Pirez, Atilio J. Brian Tejo, Carlos Pérez y Mario Otegui Báez (Empresa Estilo) y CH Rincón del Bonete: Ing. Pablo Thomasset, Ing. Alvaro Bellini, Fabian Cornalino, Miguel Tito, Luan Alvez y Luis Miguel Rodríguez. Muniz y Brugnoli agradecen a ANII-SNI. Los autores agradecen a los dos revisores que permitieron una mejoría en el documento final.

## REFERENCIAS

- Arocena, R., 2016. Sedimentos. En: Arocena, R., ed. *Principios y métodos de limnología: ejemplos de Uruguay*. Montevideo: DIRAC, Facultad de Ciencias. pp.59-72.
- Boltovskoy, D., ed., 2015. *Limnoperna fortunei. The ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel*. Berlín: Springer Nature. DOI: 10.1007/978-3-319-13494-9
- Boltovskoy D. y Correa, N., 2015. Ecosystem impacts of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei* in South America. En: *Hydrobiologia*, 746, pp.81-95. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10750-014-1882-9>
- Boltovskoy, D., Correa, N., Bordet, F., Leites, V. y Cataldo, D., 2013. Toxic Microcystis (cyanobacteria) inhibit recruitment of the bloom-enhancing invasive bivalve *Limnoperna fortunei*. En: *Freshwater Biology*, 58, pp.1968-1981.



- Boltovskoy, D., Sylvester, F., Otaegui, A., Leites, V. y Cataldo, D., 2009. Environmental modulation of reproductive activity of the invasive mussel *Limnoperna fortunei*: implications for antifouling strategies. En: *Austral Ecology*, 34, pp. 719–730. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2009.01974.x>
- Brugnoli, E., Clemente, J., Boccardi, L., Borthagaray, A. y Scarabino, F., 2005. Golden mussel *Limnoperna fortunei* (Bivalvia: Mytilidae) distribution in the main hydrographical basins of Uruguay: update and predictions. En: *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 77, pp.235-244. DOI: [10.1590/s0001-37652005000200004](https://doi.org/10.1590/s0001-37652005000200004)
- Brugnoli, E., Clemente, J.M., Riestra, G., Boccardi, L. y Borthagaray, A. 2006. Especies acuáticas exóticas en Uruguay: situación, problemática y gestión. En: Menafra, R., Rodríguez, L., Scarabino, F. y Conde, D., eds. *Bases para la conservación y manejo de la costa uruguaya*. Montevideo: Vida Silvestre. pp.351-362.
- Brugnoli, E., Dabezies, M., Clemente J.M. y Muniz, P., 2011. *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857) en el sistema de embalses del Río Negro, Uruguay. En: *Oecologia Australis*, 15(3), pp.576-592.
- Cataldo, D., 2015. Larval development of *Limnoperna fortunei*. En: Boltovskoy, D., eds. *Limnoperna fortunei: the ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel*. Berlín: Springer International Publishing. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-13494-9>
- Cataldo, D., Boltovskoy, D., Hermosa, J.L. y Canzi, C., 2005. Temperature-dependent rates of larval development in *Limnoperna fortunei* (bivalvia: mytilidae). En: *Journal of Molluscan Studies*, 71(1), pp.41–46. DOI: <https://doi.org/10.1093/mollus/eyi005>
- Cataldo, D. y Boltovskoy, D., 2000. Yearly reproductive activity of *Limnoperna fortunei* (Bivalvia) as inferred from the occurrence of its larvae in the plankton of the lower Parana river and the Rio de la Plata estuary (Argentina). En: *Aquatic Ecology*, 34, pp.307-317. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1009983920942>
- Chalar, G., Arocena, R., Pacheco, J.P. y Fabián, D., 2011. Trophic assessment of streams in Uruguay: atrophic state index for benthic invertebrates (TSI-BI). En: *Ecological Indicators*, 11, pp.362–369. DOI: 10.1016/j.ecolind.2010.06.004
- Chalar, G., Fabián, D., González-Piana, M. y Delbene, L, 2010. *Limnología de los embalses del Río Negro: noviembre 2000 – marzo 2009*. Montevideo: Facultad de Ciencias, Sección Limnología.



- Chalar, G., Fabián, D., González-Piana, M. y Delbene, L., 2012. *Informe final. Caracterización limnológica de los embalses del Río Negro durante el período Setiembre 2009- Junio2011. Convenio UTE-Facultad de Ciencias* [En línea]. Montevideo: Facultad de Ciencias, Sección Limnología. [Consulta: 05 de setiembre de 2020]. Disponible en:  
<http://limno.fcien.edu.uy/pactuales/Informe%20Rio%20Negro%202009-2011.pdf>
- Chalar, G., Fabián, D., González-Piana, M. y Piccardo, A., 2015. *Estado y evolución de la calidad de agua de los tres embalses del Río Negro (período 2011-2015)*. Montevideo: UTE, Facultad de Ciencias, Sección Limnología.
- Clemente, J.M.y Brugnoli, E., 2002. Record of *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) in continental waters of Uruguay (Río Negro and ríoYí). En: *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay*, 13, pp.29-33.
- Clemente, J.M., Iglesias, C., Kröger, A., Lagomarsino, J.J, Méndez, G., Marroni, S. y Mazzeo, N., 2015. First record of the golden mussel *Limnoperna fortunei* Dunker, 1857 (Bivalvia: Mytilidae) in a lentic system in Uruguay. En: *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 10, pp.89-93.
- Conde, D. y Sommaruga, R., 1999. A review of the state of Limnology in Uruguay. En: Wetzell, R. y Gopal, B., eds. *Limnology in developing countries 2*. Nueva Delhi: International Scientific Publications/SIL. pp.1-31.
- Damborenea, C. y Penchaszadeh, P., 2006. Biología reproductiva de *Limnoperna fortunei*. En: Darrigran, G. y Damborenea, C., eds. *Bio-invasión del mejillón dorado en el continente americano*. La Plata: Universidad Nacional de La Plata. pp.69-82.
- Darrigran, G., 2002. Potential impact of filter-feeding invaders on temperate inland freshwater environments. En: *Biological Invasion*, 4, pp.145-156.
- Darrigran, G. y Damborenea, M.C., 2005. A bioinvasion history in South America. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), the golden mussel. En: *American Malacological Bulletin*, 20, pp.105-112.
- Darrigran, G. y Ezcurra de Drago, I. 2000. Invasion of the exotic freshwater mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) in South America. En: *The Nautilus*, 114, pp.69-73.



- Darrigran, G., Damborenea, C. y Greco, N., 2007. An evaluation pattern for antimicrofouling procedures: *Limnoperna fortunei* larvae study in a hydroelectric power plant in South America. En: *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 36(7), pp.575-579.
- Darrigran, G., Martín, S.M., Gullo, B. y Armendáriz, L., 1998. Macroinvertebrates associated with *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) in Río de la Plata, Argentina. En: *Hydrobiology*, 367, pp.223-230.
- Dos Santos, C.P., Würdig, N.L. y Mansur, M.C., 2005. Fases larvais do mexilhão dourado *Limnoperna fortunei* (Dunker) (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae) na Bacia do Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. En: *Revista Brasileira de Zoologia*, 22(3), pp.702-708.
- Dodds, W. y Whiles, M., eds., 2010. *Freshwater ecology: concepts and environmental applications of limnology*. London: Elsevier. ISBN: 978-0-12-374724-2.
- Ernandes-Silva, J., Pinha, G.D. y Mormul, R.P., 2017. Environmental variables driving the larval distribution of *Limnoperna fortunei* in the upper Paraná River floodplain, Brazil. En: *Acta Limnologica Brasiliensia*, 29, e108. DOI: <https://doi.org/10.1590/s2179-975x7716>
- Ezcurra de Drago, I., Montalto, I. y Oliveros, O., 2006. Desarrollo y ecología larval de *Limnoperna fortunei*. En: Darrigran, G. y Damborenea, C., eds. *Bio-invasión del mejillón dorado em el continente americano*. La Plata: Universidad Nacional de la Plata, 220 pp.
- Gazulha, V., Mansur, M.C.D., Cybis, L.F. y Azevedo, S.M.F.O., 2012. Grazing impacts of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) on single-celled, colonial and filamentous cyanobacteria. En: *Brazilian Journal of Biology*, 72(1), pp.33-39. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842012000100004>
- Giglio, M.L., Mansur, M.C.D., Damboreanea, C., Penchaszadeh, P.E. y Darrigran G., 2016. Reproductive pattern of the aggressive invader *Limnoperna fortunei* (Bivalvia, Mytilidae) in South America. En: *Invertebrate Reproduction & Development*, 1, pp.1-10. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/07924259.2016.1174159>
- Haag, W.R. y Garton, D.W., 1992. Synchronous spawning in recently established population of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, in western Lake Erie, USA. En: *Hydrobiologia*, 234, pp.103-110.



- Langone, J.A., 2005. Notas sobre el mejillón dorado *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857) (Bivalvia, Mytilidae) em Uruguay. En: *Publicación Extra. Museo Nacional de Historia Natural y Antropología*, 1, pp.1-18.
- Mansur, M.C., Pinheiro dos Santos, C., Darrigran, G., Hydrich, I., Calli, C. y Rossoni Cardoso, F., 2003. Primeiros dados quali-quantitativos do mexilhão dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker), no Delta do Jacuí, no Lago Gauíba e na Laguna dos Patos, Río Grande do Sul, Brasil e alguns aspectos de sua invasão no novo ambiente. En: *Revista Brasileira Zoología*, 20, pp.75-84.
- Montalto, L., Oliveros, O., Ezcurra de Drago, I. y Denonte, L. 1999. Peces del río Paraná medio, predadores de una especie invasora *Limnoperna fortunei* (Bivalvia: Mytilidae). *FABICIB*, 3(1), pp.85-101.  
DOI: <https://doi.org/10.14409/fabicib.v3i1.623>
- Muniz, P., Clemente, J. y Brugnoli, E., 2005. Benthic invasive pests in Uruguay: A new problem or an old one recently perceived? En: *Marine Pollution Bulletin*, 50, pp.993-1018.
- Paolucci, E., Sardiña, P., Sylvester, F., Perepelizin, P., Zhan, A., Ghabooli, S., Cristescu, M., Oliveira, y MacIsaac, H., 2014. Morphological and genetic variability in an alien invasive mussel across an environmental gradient in South America. En: *Limnology and Oceanography*, 59(2), pp 400-412. DOI: <https://doi.org/10.4319/lo.2014.59.2.0400>
- Paolucci, E., 2021. Ventajas y límites de la variabilidad morfofisiológica para el establecimiento, la colonización y la expansión del bivalvo invasor *Limnoperna fortunei* en Sudamérica. En: *INNOTECH*, 21, pp153 – 178.  
DOI: <https://doi.org/10.26461/21.09>
- Penchaszadeh, P., Darrigran, G., Angulo, C., Averbuj, A., Brigger, M., Dogliotti, A. y Pirez, N., 2000. Predation of the invasive freshwater mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mytilidae) by the fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1846) (Anostomidae) in the Río de la Plata, Argentina. En: *Journal of Shellfish Research*, 19, pp.229–231.
- Ram, J.L., Fong, P.P. y Garton, D.W., 1996. Physiological aspects of zebra mussel reproduction: maturation, spawning, and fertilization. En: *American Zoologist*, 36, pp.326-338.



- Reavie, E.D., Jicha, T.M., Angradi, T.R., Bolgrien, D.W. y Hill, B.H., 2010. Algal assemblages for large river monitoring: Comparison among biovolume, absolute and relative abundance metrics. En: *Ecological Indicators*, 10, pp.167–177. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2009.04.009>
- Scarabino, F. y Verde, M., 1995. *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857) en la costa uruguaya del Río de la Plata (Bivalvia; Mytilidae). En: *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay*, 7, pp.374-375.
- Silva, F.A. y Giani, A., 2018. Population dynamic of bloom-forming *Microcystis aeruginosa* in the presence of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei*. En: *Harmful Algae*, 73, pp.148-156. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.02.007>
- Xu, H., Jiang, Y., Zhang, W., Zhu, M. y Al-Rasheid, K.A.S., 2011. An approach to determining potential surrogates for analyzing ecological patterns of planktonic ciliate communities in marine ecosystems. En: *Environmental Science and Pollution Research*, 18, pp.1433–1441. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0503-7>

# **Pinturas antiincrustantes derivadas de plantas terrestres: una solución segura para el ambiente en el control de la bioincrustación**

**Antifouling paints derived from terrestrial plants: a safe solution for the environment in the control of biofouling**

**Tintas anti-incrustantes derivadas de plantas terrestres: uma solução segura para o meio ambiente no controle da bioincrustação**

**Vanessa Ochi Agostini**<sup>1,\*</sup> <https://orcid.org/0000-0002-8325-254X>

**Grasiela Lopes Leães Pinho**<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7951-0334>

**Erik Muxagata**<sup>2</sup> <http://orcid.org/0000-0002-4210-5252>

**Alexandre José Macedo**<sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0002-8951-4029>

**Fabiana Rey Bentos**<sup>4</sup> <https://orcid.org/0000-0001-5931-5902>

**Lucía Boccardi**<sup>4</sup> <https://orcid.org/0000-0002-5391-2308>

**María Jesús Dabezies**<sup>5</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9909-3427>

**Ernesto Brugnoli**<sup>6</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7304-1856>

\*Autor de contacto: [nessaochi@gmail.com](mailto:nessaochi@gmail.com)

<sup>1</sup> Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática – Programa de Pós-Graduação em Oceanologia – Instituto de Oceanografia – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil

<sup>2</sup> Laboratório de Zooplâncton – Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica – Instituto de Oceanografia – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil

<sup>3</sup> Laboratório de Biofilmes e Diversidade Bacteriana – Centro de Biotecnologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil

<sup>4</sup> Latitud–Fundación LATU, Montevideo, Uruguay

<sup>5</sup> Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Montevideo, Uruguay

<sup>6</sup> Oceanografía y Ecología Marina, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

**Recepción:** 14 Agosto 2020 **Aprobación:** 15 Enero 2021

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional.

**Resumen:** Los invertebrados (por ejemplo, cirripedios y mejillones) son los principales responsables de las pérdidas económicas a nivel industrial y naval de la bioincrustación, agravada por la colonización de especies invasoras (por ejemplo, el mejillón dorado, *Limnoperna fortunei*). Se han utilizado diversas estrategias para controlar la bioincrustación. Sin embargo, no son eficientes o causan una alta mortalidad de organismos acuáticos, incluso las tintas antiincrustantes. Actualmente, con la necesidad de preservar la salud humana y ambiental, se han enfocado en la investigación de nuevos agentes naturales para reemplazar las moléculas sintéticas tóxicas de estas pinturas. El estudio de productos naturales bioactivos a partir de plantas terrestres ha sido una opción prometedora en el campo clínico y puede tener el mismo potencial en el acuático. Así, la principal pregunta de este estudio es: ¿Cómo seleccionar los extractos y compuestos más prometedores? Este trabajo analizó artículos publicados sobre el tema con el objetivo de resaltar la información necesaria para centrar las investigaciones en antiincrustantes derivados de plantas terrestres. Se examinaron 29 artículos entre 1990 y 2020. Los productos naturales derivados de plantas terrestres tienen un gran potencial como antiincrustantes sostenibles, inhibiendo la colonización de micro y macrofouling. Los compuestos alcaloides y flavonoides de las familias *Zingiberaceae*, *Myrtaceae* y *Fagaceae* ya han mostrado resultados prometedores contra mejillones.

**Palabras clave:** compuestos naturales, extractos naturales, fitoquímicos, invertebrados, mejillón.

**Abstract:** Invertebrates (e.g, barnacles, mussels) are usually the main responsible for the industrial and naval high economic costs of biofouling, aggravated by colonization of invasive species such (e.g., golden mussel, *Limnoperna fortunei*). Many strategies have been used as attempts to control biofouling. However, these are not efficient or cause high mortality of aquatic organisms, including the antifouling coatings. Currently, with the aim of preserving human and environmental health, new studies have focused on the discovery of new natural agents to replace the toxic synthetic molecules in paints. The study of bioactive natural products from terrestrial plants has been a promising option in the clinical field and they can have the same potential in the aquatic field. In this way, the main question of this study is: How to select the most promising extracts and compounds? This review evaluated the documents published on this topic, with the aim of highlighting the information necessary to focus antifouling investigations derived from terrestrial plants. A total of 29 papers were examined in this review from 1990 to 2020. Natural products derived from terrestrial plants have great potential as sustainable antifouling, inhibiting colonization of micro and macrofouling. Alkaloid and flavonoid compounds from the *Zingiberaceae*, *Myrtaceae* and *Fagaceae* families have already shown promising results against mussels.

**Keywords:** natural product, natural extract, phytochemical, invertebrates, mussel.

**Resumo:** Invertebrados (por exemplo, cirripédios, mexilhões) são os principais responsáveis pelos prejuízos econômicos industriais e navais da bioincrustação, agravados pela colonização de espécies invasoras (por exemplo, mexilhão dourado, *Limnoperna fortunei*). Muitas estratégias têm sido usadas para controlar a bioincrustação.

No entanto, não são eficientes ou causam alta mortalidade de organismos aquáticos, incluindo as tintas anti-incrustantes. Atualmente, com a necessidade de preservar a saúde humana e ambiental têm se concentrado na investigação de novos agentes naturais para substituir as moléculas sintéticas tóxicas dessas tintas. O estudo de produtos naturais bioativos de plantas terrestres tem sido uma opção promissora no campo clínico e elas podem ter o mesmo potencial no campo aquático. Desse modo, a principal pergunta deste estudo é: Como selecionar os extratos e compostos mais promissores? Este trabalho analisou artigos publicados sobre este tópico, com o objetivo de destacar as informações necessárias para focalizar a pesquisa em anti-incrustantes derivados de plantas terrestres. Foram examinados 29 artigos de 1990 a 2020. Os produtos naturais derivados de plantas terrestres têm um grande potencial como anti-incrustantes sustentáveis, inibindo a colonização de micro e macro-organismos. Compostos alcalóides e flavonóides das famílias *Zingiberaceae*, *Myrtaceae* e *Fagaceae* já apresentaram resultados promissores contra mexilhões.

**Palavras-chave:** compostos naturais, extrato natural, fitoquímicos, invertebrados, mexilhão.

## INTRODUCCIÓN

La fijación y el crecimiento de organismos acuáticos en sustratos consolidados se conoce como bioincrustación (Nandakumar y Yano, 2003). El proceso de bioincrustación comienza con la adsorción de moléculas orgánicas en superficies sumergidas y la posterior colonización de especies bacterianas que producen una sustancia polimérica extracelular (SPE) para formar un biofilm (biopelícula) (Agostini, et al., 2018). Durante el proceso de bioincrustación, varios organismos como virus, hongos, microalgas, protozoos, esporas de algas y meroplancton (por ejemplo, larvas de invertebrados) se depositan en los sustratos, iniciando una sucesión ecológica y dependiente del acople bentopelágico (Agostini, et al., 2017; 2018).

La bioincrustación es un problema económico grave ya que daña las estructuras artificiales sumergidas en el medio acuático como embarcaciones, ductos y plataformas (Schultz, et al., 2011). Este proceso no es nuevo; existen registros desde la antigüedad (WHOI, 1952). Las pérdidas económicas globales debido a la bioincrustación marina fueron de quince mil millones de dólares en 2001 (Azis, et al., 2001). Esto incluye el costo de su prevención, el mantenimiento de la infraestructura (biocorrosión, aumento de peso y obstrucción), y el consumo de combustible (Schultz, et al., 2011).

Los invertebrados son los principales responsables de los altos costos de la bioincrustación, principalmente asociados a la colonización de cirripedios y mejillones (Dobretsov y Rittschof, 2020). Los problemas aumentan cuando se asocian a la colonización de especies invasoras como el mejillón dorado, *Limnoperna fortunei* (Uliano-Silva, et al., 2018). Esta especie es un bivalvo

originario del sudeste asiático que se introdujo accidentalmente en América del Sur a principios de la década de 1990 (Maranhão y Stori, 2019). El establecimiento del mejillón dorado en América del Sur está relacionado con la facilidad de adaptación y la alta tasa de reproducción (Uliano-Silva, et al, 2018; Maranhão y Stori, 2019). Y sus impactos económicos están relacionados con la obstrucción de tuberías de captación de agua, filtros y sistemas de enfriamiento en plantas e industrias hidroeléctricas, sistemas de drenaje de aguas pluviales, daños a motores y embarcaciones, causados por incrustación y consecuente biocorrosión, cambio de forma y aumento de peso de estas estructuras (Boltovskoy y Correa, 2015; Maranhão y Stori, 2019). Después de 30 años de que el mejillón dorado invadió América del Sur, no hay signos de que esta invasión esté bajo control o incluso se esté estabilizando (Uliano-Silva, et al., 2018). Se han utilizado diversas estrategias para el control de esta especie.

La Tabla 1 presenta las principales estrategias de control utilizadas para mitigar las abundancias del mejillón dorado en sistemas invadidos (por ejemplo, tuberías de agua).

**Tabla 1.** Principales estrategias de control utilizadas contra el mejillón dorado (*Limnoperna fortunei*).

| Estrategias de control                   | Autor                           |
|--|---------------------------------|
| Velocidades rápidas de flujo (>1.5 m/s)  | Jenner, et al. (1998)           |
| Campos magnéticos                        | Jenner, et al. (1998)           |
| Corriente eléctrica                      | Katsuyama, et al. (2005)        |
| Acústica por ultrasonido                 | Santos, et al. (2012)           |
| Filtración                               | Claudi, et al. (2014)           |
| Luz ultravioleta                         | Perepelizin y Boltovskoy (2014) |
| Uso de depredadores (por ejemplo, peces) | Boltovskoy y Correa (2015)      |
| Turbulencia                              | Claudi y Oliveira (2015)        |
| Inyección de ozono                       | Maranhão y Stori (2019)         |

Sin embargo, todas estas estrategias no son eficientes o causan una alta mortalidad de larvas y deformación en los sobrevivientes (Breitig, 1965; Katsuyama, et al., 2005; Santos, et al., 2012). Otra estrategia es el control químico utilizando superficies pintadas con antiincrustantes (Fujita, et al., 2015). Aunque

se han desarrollado diversas pinturas antiincrustantes para abordar el problema de la bioincrustación (Telegdi, et al., 2016), una alternativa antiincrustante ecológicamente segura y eficiente aún no está disponible en el mercado (Konstantinou y Albanis, 2004; Agostini, et al., 2018). La eficacia real de las sustancias antiincrustantes es una preocupación importante, ya que estas actúan sobre los organismos en etapas sucesivas avanzadas, pero no garantizan la eficiencia durante todo el proceso (Teixeira, 2010). Este proceso requiere la eliminación mecánica de incrustaciones periódicamente y la aplicación posterior de pinturas (Desai, 2008; Teixeira, 2010).

Las estrategias antiincrustantes en todo el mundo incluyen pinturas con biocidas derivados de compuestos orgánicos, inorgánicos y metálicos (Telegdi, et al., 2016). Además, el ambiente acuático está bajo presión constante debido a la contaminación química y la toxicidad de los compuestos antiincrustantes tradicionales (por ejemplo, Cu, Zn, DCOIT), comprometiendo así la calidad del agua (Soroldoni, et al., 2017). La función de un biocida es evitar el asentamiento de organismos en las superficies al matarlos. Sin embargo, están asociados con una alta toxicidad para los organismos objetivo y no objetivo (Amara, et al., 2018) debido a la lixiviación de los biocidas al ambiente acuático.

Actualmente, con el objetivo de preservar la salud humana y ambiental, incluyendo la calidad del agua, es importante promover el descubrimiento de nuevos agentes naturales para reemplazar las moléculas sintéticas tóxicas (Fernández-Niño e Islam, 2017). En la investigación de bioincrustaciones, muchos extractos naturales han sido probados como reemplazos de biocidas tóxicos en pinturas antiincrustantes, presentando resultados prometedores (Salta, et al., 2013).

Los compuestos naturales son sintetizados por organismos en respuesta a condiciones ambientales extremas (Malafaia, et al., 2017). De esta manera, las plantas terrestres bajo estrés podrían ser una fuente de diferentes compuestos. Estos compuestos podrían usarse como ingredientes activos en formulaciones antiincrustantes (Maréchal y Hellio, 2009). Los estudios sobre el potencial antiincrustante del uso de productos naturales derivados de plantas terrestres son escasos (Gopikrishnan, et al., 2015; Agostini, et al., 2019; 2020). En contraste, el estudio de productos naturales bioactivos a partir del metabolismo secundario de plantas terrestres ha sido una opción prometedora en el campo clínico como defensa química contra los biofilms (Trentin, et al., 2011; Malafaia, et al., 2017). Además, pueden tener el mismo potencial en el campo acuático, inhibiendo la bioincrustación; evitando, por ejemplo, el asentamiento del mejillón dorado. Además, el uso de productos naturales de origen terrestre para producir nuevas tecnologías antiincrustantes puede introducir un concepto innovador en el mercado para disminuir los impactos en la calidad del agua (Soroldoni, et al., 2017).

Así, la principal pregunta relacionada con los productos bioactivos de plantas terrestres como alternativa antiincrustante es: ¿Cómo seleccionar los extractos y compuestos más prometedores? Este trabajo realizó una revisión de los artículos publicados sobre el tema, con el objetivo de resaltar la información necesaria para centrar las investigaciones antiincrustantes en productos prometedores de plantas terrestres. Complementariamente, se buscó información sobre posibles productos que pueden tener una acción enfocada contra el mejillón dorado.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

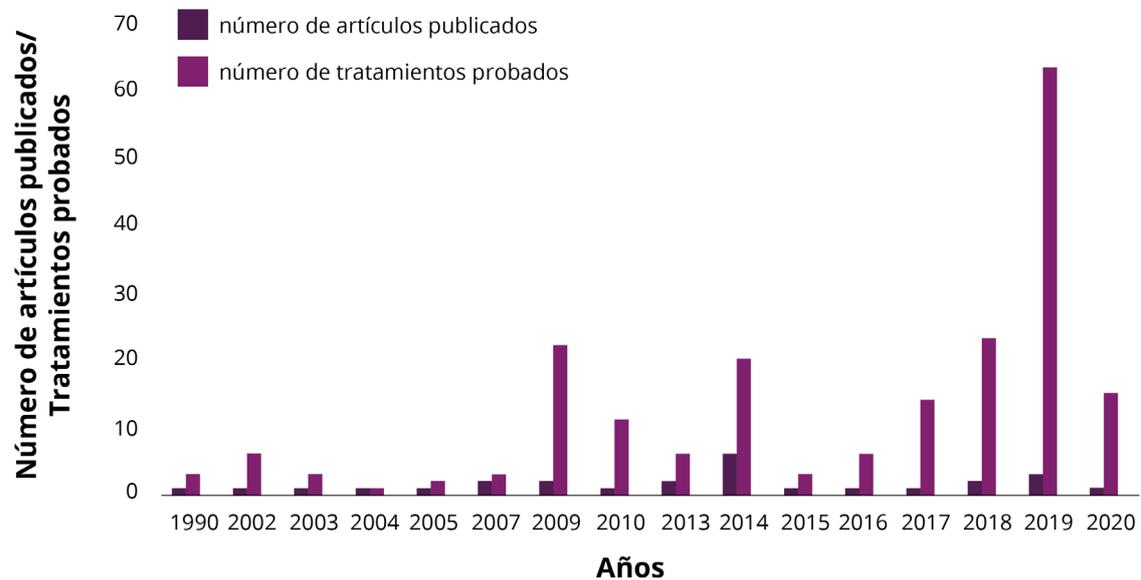
Se realizó una revisión de literatura utilizando Periódicos Capes, una base de datos que comprende colecciones que incluyen Scopus, Web of Science y Science Direct Journals. Para identificar los artículos se utilizaron combinaciones de palabras clave en inglés: (Terrestrial plants) AND (Natural products) AND (Antifouling); (Terrestrial plants) AND (Bioactive compounds) AND (Antifouling); (Phytochemical) AND (Antifouling). Los documentos recopilados fueron seleccionados de acuerdo con los siguientes criterios obligatorios: ser publicado en inglés o español en una revista indexada revisada por pares e informar la investigación de productos de plantas terrestres como alternativa antiincrustante. La literatura gris, como tesis y disertaciones, resúmenes de congresos e informes técnicos, no se consideró en esta revisión. Todas las referencias citadas en estos documentos también se seleccionaron y se ajustaron a los criterios establecidos.

A partir de la mencionada búsqueda se organizaron los trabajos identificados de acuerdo con el tipo de tratamiento, las familias de plantas terrestres identificadas, las secciones de plantas consideradas para tratamiento, los compuestos de moléculas activas y el tipo de biofouling considerado para el ensayo (macrofouling y microfouling). Se realizó un análisis de correspondencia para ordenar los datos antes mencionados con el fin de encontrar correspondencia entre ellos, utilizando el programa PAST 3.25 (Hammer y Harper, 2006).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Se examinaron 604 artículos, y 29 se analizaron en detalle, considerando el período entre 1990 y marzo de 2020. La mayoría de los tratamientos citados en base a plantas terrestres para inhibir la bioincrustación se concentró en ensayos (92%) y el 8% en revisiones de literatura. Entre los productos naturales derivados de plantas terrestres, 38% fueron probados in situ y 62% en laboratorio. La mayoría de los estudios (50%) se centró en los efectos de fitoquímicos específicos (compuestos o moléculas), el 47% en efectos del extracto crudo y el 3% ha ensayado ambos. La mayoría de las pruebas se realizaron para evaluar el potencial antiincrustante contra los invertebrados (69%) y contra microorganismos (40%), o ambos. Solo el 36% de los estudios evaluó los efectos toxicológicos de los

tratamientos. La Figura 1 presenta el rango de artículos publicados y los tratamientos probados, utilizando productos naturales derivados de plantas terrestres como posibles antiincrustantes.



**Figura 1.** Número de artículos publicados y número de tratamientos probados sobre el uso de productos naturales de plantas terrestres como posibles antiincrustantes.

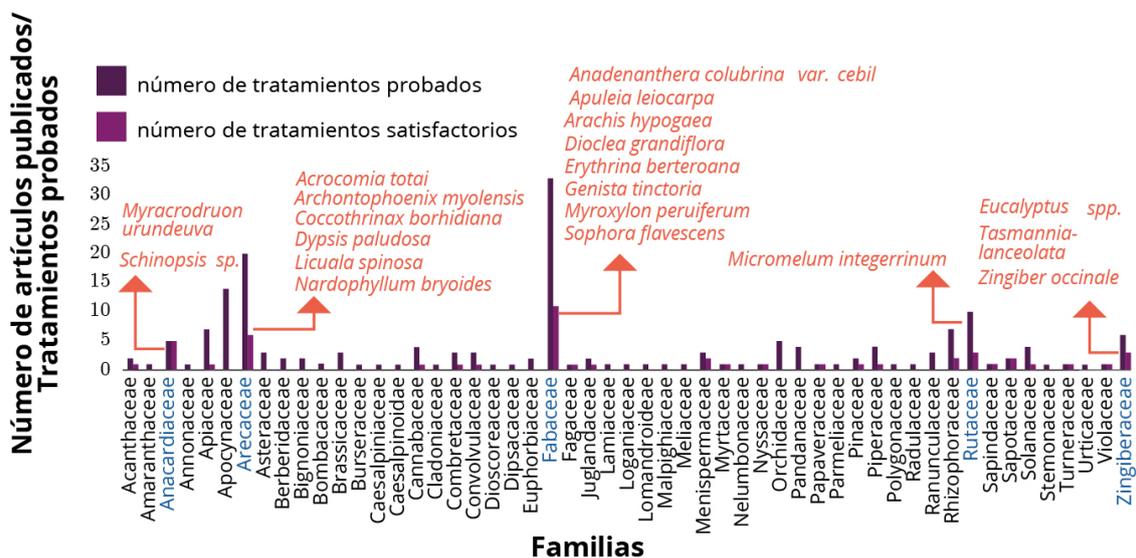
Como se puede observar en la Figura 1, el número de tratamientos antiincrustantes probados derivados de plantas terrestres a lo largo del tiempo ha fluctuado, con un aumento a partir de 2009. El máximo registrado se identifica en 2019, con un número bajo y constante de publicaciones desde 1990, con el mayor número de publicaciones registradas en 2014. Según Omae (2003), en la década de 1980 se exploraron extractos de plantas terrestres como fuente de compuestos antiincrustantes, pero fueron reemplazados por investigaciones sobre organismos marinos en la década de 1990 (Gopikrishnan, et al., 2015). Con respecto a la bioincrustación acuática, la mayoría de los extractos de plantas y compuestos analizados provenían de algas marinas (Cho, et al., 2001; Manilal, et al., 2010; Prabhakaran, et al., 2012; Dahms y Dobretsov, 2017). Algunos estudios analizaron extractos crudos de plantas terrestres, o compuestos aislados contra la bioincrustación inicial (Devi, et al., 1997; Prabhakaran, et al., 2012; Liu, et al., 2019) o tardía (Goransson, et al., 2004; Zhou, et al., 2009; Moodie, et al., 2018). Prabhakaran y otros (2012) compararon extractos de plantas acuáticas y terrestres contra cepas de bacterias aisladas de biofilm, y observaron que el extracto de plantas terrestres tenía una mayor actividad inhibidora contra el biofilm que las algas y los pastos marinos. Esto demuestra la importancia de investigar extractos de plantas de ambientes terrestres (Agostini, et al., 2020). Sin embargo, si el número de estudios con plantas terrestres como antiincrustantes es bajo, cabe

hacerse la siguiente pregunta: ¿Por qué evaluar el potencial de los productos naturales derivados de plantas terrestres como posibles antiincrustantes?

Las plantas han desarrollado un complejo sistema de defensa que comprende una complicada gama de productos químicos (Boy, et al., 2018); y diversas plantas terrestres se han utilizado como medicina alternativa en todo el mundo, lo que demuestra las actividades clínicas antibacterianas y antibiofilm (Malafaia, et al., 2017). Las plantas terrestres son más fáciles de muestrear, y es posible cultivarlas, lo que permite un mayor número de ensayos y evaluaciones de forma sostenida (Agostini, et al., 2019), con varias formas conocidas de extraer los compuestos de interés (Agostini, et al., 2020).

Además, de los tratamientos evaluados en esta revisión de literatura surge que el 32% presentó resultados satisfactorios, y el 19%, resultados parcialmente satisfactorios. En el Anexo 1 se presenta la información de los tratamientos que obtuvieron resultados satisfactorios en la inhibición de la bioincrustación.

¿Qué familias y especies de plantas terrestres son responsables de los efectos antiincrustantes? Entre los tratamientos con resultados satisfactorios de inhibición de la bioincrustación, las familias *Fabaceae*, *Anacardiaceae*, *Arecaceae*, *Zingiberaceae* y *Rutaceae* se destacaron por presentar al menos cuatro pruebas y el 30% o más con resultados positivos (Figura 2).



**Figura 2.** Familias y especies de plantas terrestres evaluadas como posibles antiincrustantes. Las familias con resultados más satisfactorios se indican en azul.

La mayoría de los resultados satisfactorios se observaron en ocho especies de la familia *Fabaceae*, pertenecientes a ocho géneros diferentes (Stupak, et al., 2003; Zhou, et al., 2009; Qian, et al., 2010; Feng, et al., 2018; Agostini, et al., 2019; Clasen

y Kesel, 2019). La familia *Fabaceae*, también llamada *Leguminosae*, es una de las familias botánicas más grandes e importantes (Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002), y está compuesta por aproximadamente 19.000 especies distribuidas en 695 géneros (Giulietti, et al., 2005). Esta familia está formada por árboles, arbustos, lianas y hierbas, y tiene una distribución cosmopolita (Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002).

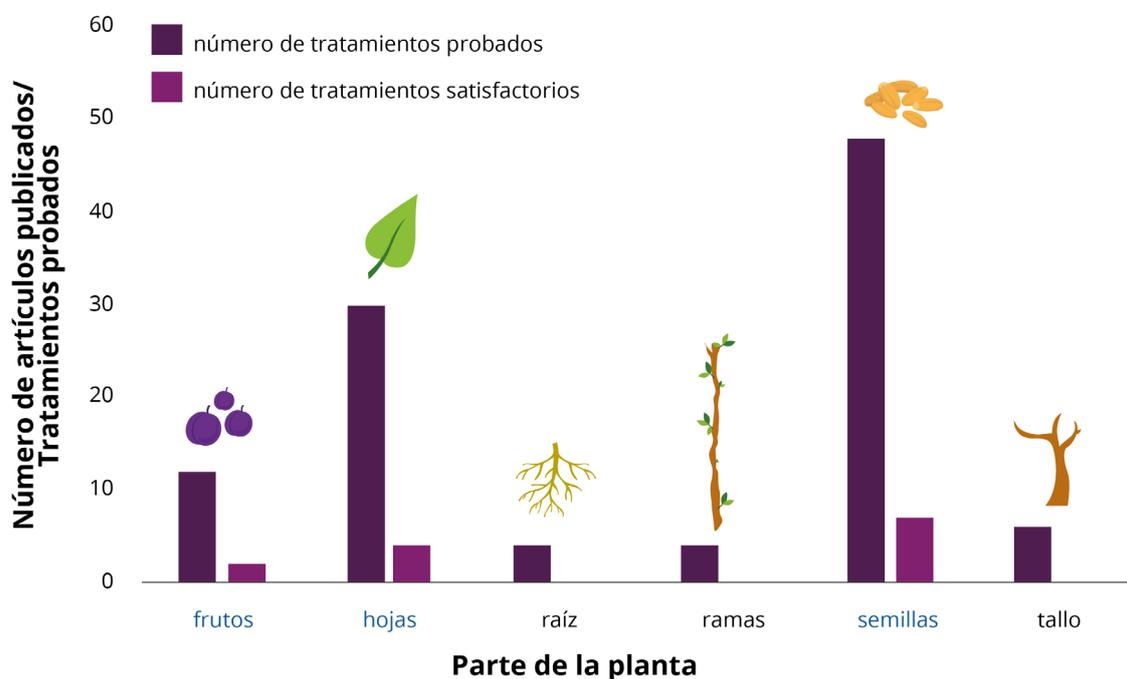
La familia *Anacardiaceae* también mostró resultados antiincrustantes positivos para dos especies, pertenecientes a dos géneros (Stupak, et al., 2003; Pérez, et al., 2007; Zhou, et al., 2009; Qian, et al., 2010; Bellotti, et al., 2014; Agostini, et al., 2020). *Anacardiaceae* es una familia compuesta por unos 76 géneros y 850 especies de árboles y arbustos, más raramente de lianas y hierbas perennes, distribuidas principalmente en áreas tropicales y subtropicales de todo el mundo (Pell, et al., 2011); y ha sido muy prometedora en la búsqueda de sustancias bioactivas (Correia, et al., 2006; Agra, et al., 2007).

Otra familia con resultados satisfactorios es *Arecaceae*. Seis especies de esta familia, pertenecientes a seis géneros diferentes, mostraron resultados positivos de inhibición de la bioincrustación (Pérez, et al., 2014; Clasen y Kesel, 2019). Esta familia está compuesta por 200 géneros y aproximadamente 2.800 especies (Medeiros-Costa, 2002), siendo popularmente compuesta de palmeras con gran variedad morfológica. La familia *Zingiberaceae* también mostró resultados antiincrustantes satisfactorios asociados con tres especies de plantas, pertenecientes a tres géneros (Etoh, et al., 2002). *Zingiberaceae* es la familia más grande de plantas herbáceas perennes, la cual contiene aproximadamente 1.400 especies divididas en 47 géneros (Holtum, 1950). Las especies están ampliamente distribuidas y se utilizan como remedio tradicional en los trópicos debido a sus fitoquímicos (Pancharoen, et al., 2000).

Una especie de la familia *Rutaceae* también mostró la capacidad de inhibir la bioincrustación (Zhou, et al., 2009). La familia *Rutaceae* tiene alrededor de 140 géneros y 2.000 especies (Cabral, et al., 2012); está compuesta por hierbas, arbustos y pequeños árboles que crecen en todas partes del mundo (Sandjo, et al., 2014; Sichaem, et al., 2014), y se usa en medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades (Sandjo, et al., 2014).

¿Cuáles son los principales lugares de origen de las plantas terrestres responsables de los efectos antiincrustantes, y qué partes de las plantas presentan mayor actividad? En relación con los principales lugares de origen de las plantas con resultados antiincrustantes satisfactorios, el 85% se puede encontrar en regiones tropicales, el 38% en regiones subtropicales y solo el 12% en regiones templadas. Algunas de las plantas se distribuyen en más de un área geográfica. Entre los países de la colección, se destacan Brasil, China, Argentina e India. Entre los tratamientos probados con resultados más satisfactorios en la

inhibición de la bioincrustación, se destacan los extractos crudos, compuestos o moléculas derivados de frutos, semillas (órganos reproductivos) y hojas (órganos vegetativos) (Figura 3).

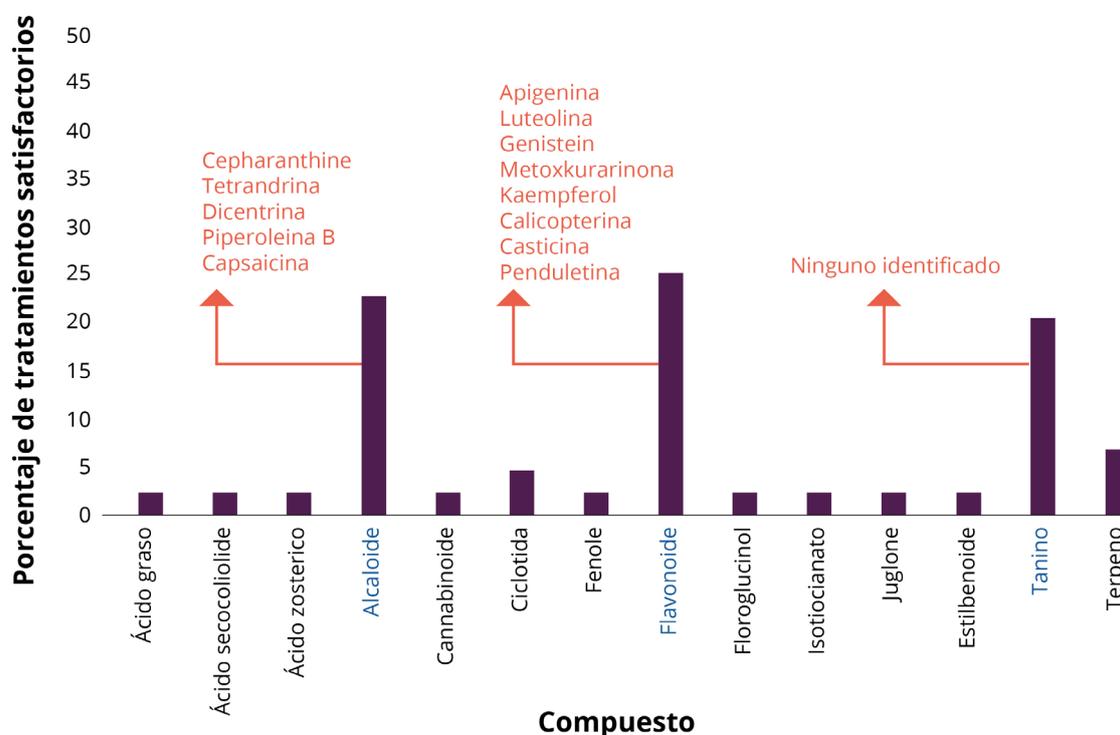


**Figura 3.** Parte de plantas terrestres evaluadas como posibles antiincrustantes. Las partes con los resultados más satisfactorios se indican en azul

Los frutos de las plantas tienen como función básica proteger, conservar y garantizar el desarrollo de las semillas. Su forma está estrechamente vinculada a su forma de polinización (Raven, et al., 1992). Las frutas presentan diferentes compuestos bioactivos con acción antimicrobiana (Liu, 2004; Karasawa y Mohan, 2018). Las semillas tienen un fuerte mecanismo de defensa, posiblemente debido a la presencia de fito-constituyentes que contribuyen a la actividad antioxidante y antimicrobiana (Kothari y Seshadri, 2010). Existen numerosos informes en la literatura sobre la presencia de sustancias bioactivas en semillas de plantas que sirven como atrayentes para dispersar semillas de animales (Kothari y Seshadri, 2010). La función principal de las hojas es capturar la luz solar para fabricar reservas de alimentos e intercambio de gases (fotosíntesis y respiración), además son transpirables. La cantidad y la calidad de las hojas de las plantas pueden cambiar estacionalmente. Las hojas también pueden adaptarse para realizar otras funciones en la planta, como la defensa a través de la producción de sustancias tóxicas (Appezato-da-Glória, et al., 2006). Los extractos de raíces, ramas y tallos, como se muestra en la Figura 3, no se consideraron antiincrustantes satisfactorios.

¿Cuáles son los compuestos y moléculas más activos derivados de plantas terrestres con efectos antiincrustantes? Entre los resultados obtenidos en los

estudios incluidos en esta revisión, los flavonoides, taninos y alcaloides fueron los compuestos responsables de los porcentajes más altos de tratamientos antiincrustantes satisfactorios (Figura 4).



**Figura 4.** Compuestos químicos y moléculas derivadas de plantas terrestres con actividades antiincrustantes satisfactorias. Los compuestos químicos con los resultados más satisfactorios se indican en azul.

Los alcaloides son compuestos nitrogenados ampliamente distribuidos en diferentes grupos de plantas (Cordell, 1981). Farmacológicamente activos, son derivados de aminoácidos que contienen uno o más átomos de nitrógeno heterocíclicos. Los alcaloides en las plantas sirven como agentes anti-herbívoros, quimioprotectores o como reguladores del crecimiento (Buchanan, et al., 2000). Se han usado alcaloides en forma de extractos de plantas para venenos, narcóticos, estimulantes y medicamentos durante varios miles de años. Por lo tanto, muchas de las drogas comunes que se usan en la actualidad están basadas en alcaloides. Debido a esta complejidad química, los alcaloides a menudo se obtienen de la fuente de la planta en lugar de producirse sintéticamente (Cseke, et al., 2006).

Los alcaloides son compuestos nitrogenados ampliamente distribuidos en diferentes grupos de plantas (Cordell, 1981). Farmacológicamente activos, son derivados de aminoácidos que contienen uno o más átomos de nitrógeno heterocíclicos. Los alcaloides en las plantas sirven como agentes anti-herbívoros, quimioprotectores o como reguladores del crecimiento (Buchanan, et al., 2000).

Se han usado alcaloides en forma de extractos de plantas para venenos, narcóticos, estimulantes y medicamentos durante varios miles de años. Por tanto, muchas de las drogas comunes que se usan en la actualidad están basadas en alcaloides. Debido a esta complejidad química, los alcaloides a menudo se obtienen de la fuente de la planta en lugar de producirse sintéticamente (Cseke, et al., 2006).

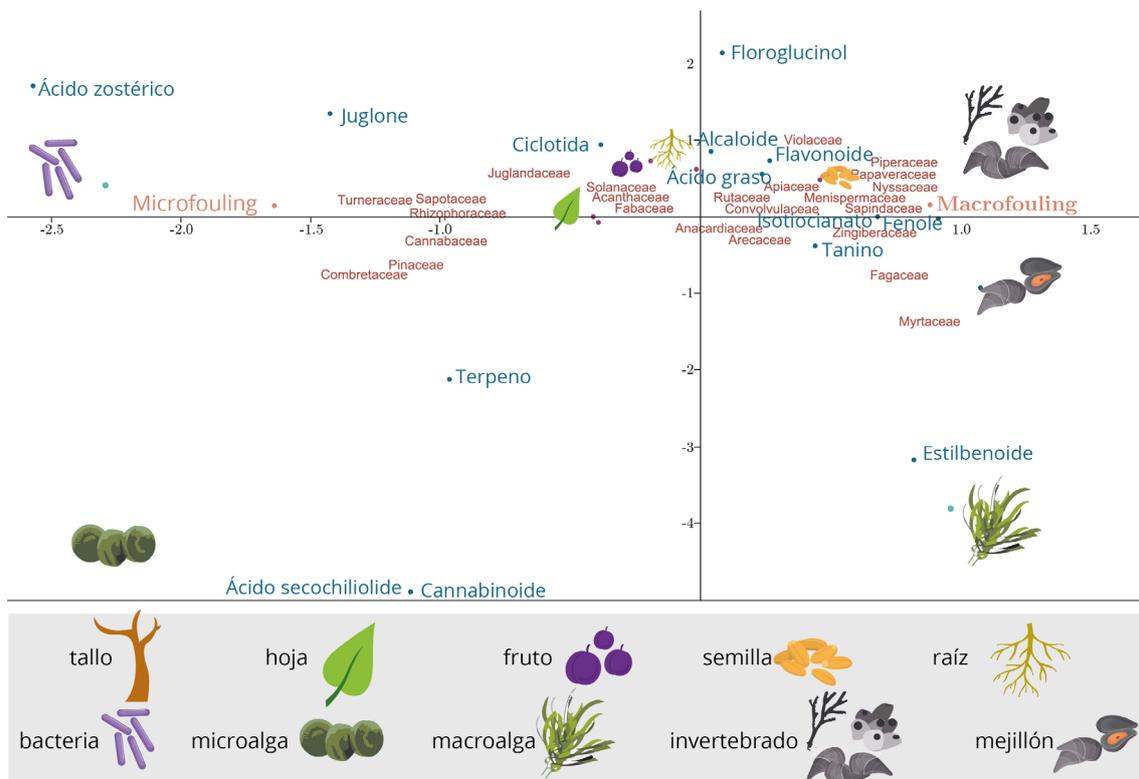
Los flavonoides tienen dos anillos de benceno separados por una unidad de propano y derivan de la flavona. Generalmente son compuestos solubles en agua. Los compuestos más conjugados son a menudo de colores brillantes. Generalmente se encuentran en plantas como sus glucósidos, lo que puede complicar las determinaciones de la estructura. Las diferentes clases dentro del grupo se distinguen por los anillos heterocíclicos adicionales que contienen oxígeno y grupos hidroxilos (Williams y Grayer, 2004).

Los taninos son oligómeros solubles en agua, ricos en grupos fenólicos, capaces de unir o precipitar proteínas solubles en agua (Hagerman y Butler, 1989). Los taninos, comunes a las plantas vasculares, existen principalmente dentro de los tejidos leñosos, pero también se pueden encontrar en las hojas, flores o semillas. Los tejidos vegetales que tienen un alto contenido de tanino poseen un sabor muy amargo, y la mayoría de los alimentadores los evitan (Cseke, et al., 2006). Ningún estudio ha identificado moléculas derivadas de taninos. Los demás compuestos químicos y moléculas, como se muestra en la Figura 4, no se consideraron antiincrustantes satisfactorios.

¿Qué organismos son inhibidos por productos naturales derivados de plantas terrestres? Entre los resultados obtenidos en los artículos, se identifican bacterias (microfouling) e invertebrados (macrofouling) como organismos objetivos para la inhibición. El 24% de los resultados antiincrustantes satisfactorios se centraron en el microfouling (Xu, et al., 2005; Qian, et al., 2010; Salta, et al., 2013; Pérez, et al., 2014; Nandhini y Revathi, 2016; Moodie, et al., 2018; Agostini, et al., 2019; 2020; Nadir, et al., 2020), el 61% en el macrofouling (Takasawa, et al., 1990; Etoh, et al., 2002; Stupak, et al., 2003; Goransson, et al., 2004; Angarano, et al., 2007; Pérez, et al., 2007; Feng, et al., 2009; Zhou, et al., 2009; Qian, et al., 2010; Bellotti, et al., 2014; Cui, et al., 2014; Huang, et al., 2014; Pérez, et al., 2014; Bogdan, et al., 2018; Feng, et al., 2018; Clasen y Kesel, 2019), y el 14% en ambas comunidades. En el Anexo 2 se presenta la lista de organismos inhibidos por la acción de extractos, compuestos o moléculas derivadas de plantas terrestres.

Las características de las plantas terrestres que condujeron a la actividad antiincrustante fueron diferentes entre el microfouling y macrofouling (Figura 5). La inhibición del microfouling está más asociada con los compuestos Juglone, Ciclotida, Ácido zostérico, Terpeno, Ácido secochiliolide y Cannabinoide; a las hojas, frutos, tallos y raíces; y a las familias *Turmeraceae*, *Sapotaceae*,

*Rhizophoraceae*, *Juglandaceae*, *Solanaceae*, *Acanthaceae*, *Fabaceae*, *Cannabaceae*, *Pinaceae* y *Combretaceae*. Mientras que la inhibición de macrofouling está más relacionada con los compuestos Flavonoide, Alcaloide, Ácido graso, Floroglucinol, Isotiocianato, Fenole, Tanino, Estilbenoide; a la semilla; y a familias *Rutaceae*, *Violanaceae*, *Anacardiaceae*, *Arecaceae*, *Zingiberaceae*, *Apiaceae*, *Covolvulaceae*, *Piperaceae*, *Myrtaceae*, *Papaveraceae*, *Nyssaceae*, *Fagaceae*, *Menispermaceae* y *Sapindaceae*. Esta diferencia probablemente se deba al hecho de que la mayoría de los estudios ha evaluado los tratamientos solo para una de las comunidades (micro o macrofouling). Solo un estudio evaluó los efectos antiincrustantes considerando micro y macrofouling (Pérez, et al., 2014). Estos autores realizaron las pruebas *in situ* en Mar del Plata (Argentina), en el verano de 2008. Los resultados indicaron que las pinturas a base de ácido secochiliolide inhibieron por completo el asentamiento de invertebrados y macroalgas. Además, se registró una menor densidad y diversidad de especies de microfouling. En la Figura 5 también es posible observar que tanto las bacterias y microalgas (microfouling) como las macroalgas e invertebrados (macrofouling) presentaron diferentes relaciones con las características inhibitorias de las plantas terrestres, que pueden explicarse porque la mayoría de los estudios ha evaluado los tratamientos solo para un grupo de organismos.



**Figura 5.** Análisis de correspondencia ordenando las familias, las partes y los compuestos químicos de las plantas terrestres que presentaron datos

antiincrustantes satisfactorios en relación con el tipo de comunidad (explicación de los primeros dos ejes = 25%).

### *Microfouling*

La mayoría de los estudios (98%) evaluó los tratamientos contra una comunidad bacteriana en lugar de una bacteria aislada. Los biofilms naturales consisten en un consorcio de especies que se influyen entre sí de manera sinérgica y antagónica (Pichlmaier, et al., 2008; Macedo y Abraham, 2009). Los ensayos de microfouling pueden realizarse con muchas bacterias de biofilm en varios filamentos y géneros, distribuidos geográficamente en todo el mundo (Lee, et al., 2008; Leary, et al., 2014; Muthusamy, et al., 2017). Por ejemplo, las bacterias gram negativas representan la composición bacteriana de biofilm heterotrófica que se encuentra en las estructuras hechas por el hombre en todo el mundo (Gupta, 2000; Muthusamy, et al., 2017).

Además de eso, es necesario evaluar si la actividad antiincrustante es antibiofilm o antibiótico. Aunque las actividades antibacterianas y de antibiofilm reflejan una inhibición bacteriana marina, el efecto antibiofilm es más interesante ya que no elimina las bacterias planctónicas, evitando la colonización del sustrato y, lo que es más importante, no impone presión sobre las bacterias para la adquisición de resistencia (Agostini, et al., 2020).

Según Agostini y otros (2017, 2018), la formación de biofilms bacterianos se considera un requisito previo para las incrustaciones de algas e invertebrados. Los factores que influyen en el asentamiento de invertebrados en sustratos duros aún no se conocen bien. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que los biofilms bacterianos podrían ser el desencadenante necesario para la sucesión ecológica en superficies de sustrato duro sumergidas en el medio acuático (Agostini, et al., 2017; 2018; Freckelton, et al., 2017). Esto se debe a que el modelo de facilitación supone que sólo ciertas especies de "sucesión temprana" pueden colonizar el sustrato virgen debido a sus características específicas. Estos primeros colonos modifican el entorno para hacerlo más adecuado para otras especies de "sucesión tardía" (Jenkins y Martins, 2010). De esta manera, los resultados observados como positivos en cuanto a la inhibición de microfouling pueden aplicarse a macrofouling.

### *Macrofouling*

La mayoría de los estudios (83%) evaluó los tratamientos contra una comunidad de invertebrados en lugar de algas, principalmente contra artrópodos, poliquetos y moluscos. La inhibición de mejillones está más relacionada con los compuestos Isotiocianato, Fenole y Tanino, y con las familias *Zingiberaceae*, *Myrtaceae* y *Fagaceae*. Ningún trabajo incluido en esta revisión ha

evaluado los efectos de los tratamientos sobre la inhibición del mejillón dorado. Sin embargo, algunos estudios mostraron resultados positivos para otras especies de mejillones (Takasawa, et al., 1990; Etoh, et al., 2002; Angarano, et al., 2007). Takasawa y otros (1990) aplicaron glucósido de kaempferol acilado, un flavonoide, aislado de hojas de *Quercus dentata* (Fagaceae) y raponticinas aciladas, un estilbenoide, de hojas de *Eucalyptus rubida* (Myrtaceae) como sustancias activas, realizando ensayos con *Mytilus edulis* (mejillón azul). Como estos compuestos contienen grupos fenólicos, repelió el asentamiento. Etoh y otros (2002) probaron que trans-6-, 8-, and 10-shogaols (alcaloide) de un extracto de las raíces de jengibre, *Zingiber officinale* (*Zingiberaceae*), mostraron la actividad antiincrustante más alta contra *Mytilus edulis*. Mientras Angarano y otros (2007) evaluaron la capsaicina de productos naturales derivados de plantas por su potencial para inhibir la fijación del biso de *Dreissena polymorpha* (mejillón cebra). Esta prueba reveló que la capsaicina (8-methyl-Nvanillyl-trans-6-nonenamide), un alcaloide, inhibió la fijación del biso, siendo considerado un producto prometedor.

Cabe señalar que, a pesar de los resultados satisfactorios de inhibición de la bioincrustación, menos de la mitad (48%) de los tratamientos evaluó la toxicidad potencial de productos derivados de plantas terrestres. Por un lado, algunos autores garantizan la ausencia de toxicidad (Angarano, et al., 2007); por otro lado, hay evidencia en la literatura sobre posibles efectos fisiológicos de compuestos vegetales en mamíferos (Ekiert y Kisiel, 1997); por lo tanto, los tratamientos deben ser probados y evaluados previamente para encontrar la mejor dosis-respuesta, utilizando especies sensibles de varios niveles tróficos.

De acuerdo con Ralston y Swain (2009), además de la no toxicidad, las nuevas alternativas químicas antiincrustantes deben centrarse en los siguientes parámetros: permitir al menos cinco años de control de bioincrustación; ser duraderas, resistentes a los daños y reparables; ser rentables y de bajo mantenimiento; ser fáciles de aplicar; y eficaces, sin y con flujo. Además, se debería incorporar como parámetro que la alternativa química debe ser amigable con el medio ambiente.

## CONCLUSIONES

Los productos naturales derivados de plantas terrestres tienen un gran potencial como antiincrustantes sostenibles, inhibiendo la colonización de bacterias, microalgas, macroalgas e invertebrados. Sin embargo, se deben realizar más estudios, siempre dirigidos a la comunidad bioincrustante en su conjunto y con pruebas ecotoxicológicas apropiadas. Las plantas terrestres de las familias *Fabaceae*, *Anacardiaceae*, *Arecaceae*, *Zingiberaceae* y *Rutaceae*, así como los extractos hechos de hojas, frutos y semillas, tienen el mayor potencial antiincrustante. Con respecto a la inhibición específica de los mejillones, los

compuestos alcaloides y flavonoides ya han mostrado resultados prometedores, derivados de las familias *Zingiberaceae*, *Myrtaceae* y *Fagaceae*. En tanto, se identifica la ausencia de estudios relacionados con el uso de este tipo de antiincrustantes para el biofouling ocasionado específicamente por el mejillón dorado.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores pertenecen a un grupo de trabajo interinstitucional e interdisciplinario con potencial de trabajo en distintas escalas y en diversidad de ambientes acuáticos en Brasil y Uruguay. Agradecen a la Universidade Federal do Rio Grande (FURG), la Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), al Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), a Latitud-Fundación LATU y a la Facultad de Ciencias, Universidad de la República (Udelar).

## REFERENCIAS

- Agostini, V.O., Ritter, M.N., Macedo, A.J. Muxagata, E. y Erthal, F., 2017. What determines sclerobiont colonization on marine mollusk shells? En: *PLoS ONE*, 12, e0184745. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184745>
- Agostini, V.O., Macedo, A.J. y Muxagata, E., 2018. O papel do biofilme bacteriano no acoplamento bento-pelágico, durante o processo de bioincrustação. En: *Revista Liberato*, 19(31), pp.1–134. <https://doi.org/10.31514/rliberato.2018v19n31.p23>
- Agostini, V.O., Macedo, A.J. Muxagata, E. Silva, M.V.da y Pinho, G.L.L., 2019. Natural and non-toxic products from Fabaceae Brazilian plants as a replacement for traditional antifouling biocides: an inhibition potential against initial biofouling. En: *Environmental Science and Pollution Research*, 26, pp.27112–27127 <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05744-4>
- Agostini, V.O., Macedo, A.J. Muxagata, E. Silva, M.V.da y Pinho, G.L.L., 2020. Non-toxic antifouling potential of Caatinga plant extracts: effective inhibition of marine initial biofouling. En: *Hydrobiologia*, 847, pp.45–60. <https://doi.org/10.1007/s10750-019-04071-6>
- Amara, I., Miled, W., Slama, R.B. y Ladhari, N., 2018. Antifouling processes and toxicity effects of antifouling paints on marine environment. A review. En: *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 57, pp.115–130. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.12.001>

- Angarano, M-B., McMahon, R.F., Hawkins, D.L. y Schetz, J.A., 2007. Exploration of structure-antifouling relationships of capsaicin-like compounds that inhibit zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) macrofouling. *Biofouling: En: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 23(5), pp.295-305. <https://doi.org/10.1080/08927010701371439>
- Agra, M.F., Freitas, P.F. y Barbosa-Filho, J.M., 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *En: Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 17, pp.114-140. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100021>
- Appezato-da-Glória, B. y Carmello-Guerreiro, S.M., 2006. *Anatomia vegetal*. 2a ed. Viçosa: Editora UFV. 430 p.
- Azis, P.K.A., Al-Tisan, I. y Sasikumar, N., 2001. Biofouling potential and environmental factors of seawater at a desalination plant intake. *En: Desalination*, 135, pp.69–82. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(01\)00140-0](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(01)00140-0)
- Bellotti, N., Amo, B. y Romagnoli, R., 2014. Assessment of tannin antifouling coatings by scanning electron microscopy. *En: Progress in Organic Coatings*, 77, pp.1400–1407. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2014.05.004>
- Bogdan, S., Deya, C., Micheloni, O., Bellotti, N. y Romagnoli, R. Natural products to control biofilm on painted surfaces. *En: Pigment & Resin Technology*, 47(2), pp.180-187. <https://doi.org/10.1108/PRT-01-2017-0004>
- Boltovskoy, D. y Correa, C., 2015. Ecosystem impacts of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei* (golden mussel) in South America. *En: Hydrobiologia*, 746, pp.81–95. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-1882-9>
- Boy, H.I.A, Rutilla, A.J.H., Santos, K.A., Ty, A.M.T., Yu, A.I., Mahboob, T., Tangpoong, J. y Nissapatorn, V., 2018. Recommended medicinal plants as source of natural products: a review. *En: Digital Chinese Medicine*, 1(2), pp.131-142. [https://doi.org/10.1016/S2589-3777\(19\)30018-7](https://doi.org/10.1016/S2589-3777(19)30018-7)
- Breitag, G., 1965. *The use of ultrasound in the eradication of larvae*. Greiswald: University Greiswald. (Tesis de doctorado).
- Buchanan, R.B., Grisse, W. y Jones, R.L., 2000. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists. 1280 p.

- Cabral, R.S., Sartori, M.C., Cordeiro, I., Queiroga, C.L., Eberlin, M.N., Lago, J.H.G., Moreno, P.R.H. y Young, M.C.M., 2012. Anticholinesterase activity evaluation of alkaloids and coumarin from the stems of *Conchocarpusfontanesianus*. En: *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22(2), pp.374-380. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000219>
- Cho, J.Y., Kwon, E.-H., Choi, J.-S., Hong, S.-Y., Shin, H.-W. y Hong, Y.-K., 2001. Antifouling activity of seaweed extracts on the green alga *Enteromorpha prolifera* and the mussel *Mytilus edulis*. En: *Journal of Applied Phycology*, 13(2), pp.117-125. <https://doi.org/10.1023/A:1011139910212>
- Clasen, A. y Kesel, A.B., 2019. Microstructural surface properties of drifting seeds—a model for non-toxic antifouling solutions. En: *Biomimetics*, 4, 37. <https://doi.org/10.3390/biomimetics4020037>
- Cordell, G., 1981. *Introduction to alkaloids: a biogenetic approach*. Nueva York: Wiley and Sons. 1055 pp.
- Correia, S.de J., David, J.P. y David, J.M., 2006. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. En: *Química Nova*, 6, pp.1287-1300. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000600026>
- Cseke, L.J., Kirakosyan, A., Kaufman, P.B., Warber, S.L., Duke, J.A., Briemann, H.L., 2006. *Natural products from plants*. 2ª ed. Boca Ratón: CRC Press. 569 p.
- Cui, Y.T., Teo, S.L.M., Leong, W. y Chai, C.L.L., 2014. Searching for “Environmentally-Benign” antifouling biocides. En: *International Journal of Molecular Sciences*, 15, pp.9255-9284. <https://doi.org/10.3390/ijms15069255>
- Dahms, H.U. y Dobretsov, S., 2017. Antifouling compounds from marine macroalgae. En: *Marine Drugs*, 15(9), pp.265. <https://doi.org/10.3390/md15090265>
- Desai, D.V., 2008. Impact of Irgarol 1051 on the larval development and metamorphosis of *Balanus amphitrite* Darwin, the diatom *Amphora coffeaformis* and natural biofilm. En: *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 24(5), pp.393-403. <https://doi.org/10.1080/08927010802339764>
- Devi, P., Solimabi, W., D’Souza, L., Sonak, S., Kamat, S.Y. y Singbai, S.Y.S., 1997. Screening of some marine plants for activity against marine fouling bacteria. En: *Botanica Marina*, 40, pp.87-91. <https://doi.org/10.1515/botm.1997.40.1-6.87>

- Di Stasi, L.C. y Hiruma-Lima, C.A., 2002. *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. 2. San Pablo: São Paulo. 608 p.
- Dobretsov, S. y Rittschof, D., 2020. Love at first taste: induction of larval settlement by marine microbes. En: *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), pp.731. <https://doi.org/10.3390/ijms21030731>
- Ekiert, H. y Kisiel, W., 1997. Coumarins and alkaloids in shoot culture of *Ruta graveolens*. En: *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 66(3-4), pp.329-332. <https://doi.org/10.5586/asbp.1997.039>
- Etoh, H., Kondoh, T., Noda, R., Singh, I.P., Sekiwa, Y., Morimitsu, K. y Kubota, K., 2002. Shogaols from *Zingiber officinale* as Promising Antifouling Agents. En: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(8), pp.1748-1750. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.1748>
- Feng, D.Q., Ke, C.H., Lu, C.Y. y Li, S.J., 2009. Herbal plants as a promising source of natural antifoulants: evidence from barnacle settlement inhibition. En: *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 25(3), pp.181-190, <https://doi.org/10.1080/08927010802669210>
- Feng, D.Q., He, J., Chen, S.Y., Su, P., Ke, P.H. y Wang, W., 2018. The plant alkaloid camptothecin as a novel antifouling compound for marine paints: laboratory bioassays and field Trials. En: *Marine Biotechnology*, 20(5), pp.623-638. <https://doi.org/10.1007/s10126-018-9834-4>
- Fernández-Niño M, e Islam Z., 2017. The potential of synthetic biology for improving environmental quality and human health in developing countries. En: *Salud UIS*, 49(1), pp.10 p.
- Freckelton, M.-L., Nedved, B.T. y Hadfield, M.G., 2017. Induction of invertebrate larval settlement; different bacteria, different mechanisms? En: *Scientific Reports*, 7, pp.42557. <https://doi.org/10.1038/srep42557>
- Fujita, D.S., Takeda, A.M., Coutinho, R. y Fernandes, F.C., 2015. Influence of antifouling paint on freshwater invertebrates (Mytilidae, Chironomidae and Naididae): Density, richness and composition. En: *Brazilian Journal of Biology*, 75(4), suppl. 1, pp.S70-S78. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.05114>

- Giulietti, A.M., Harley, R.M., Queiroz, L.P., Wanderley, M.G. y Berg, C.V.B., 2005. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil [En línea]. En: *Megadiversidade*, 1, pp.52-60. [Consulta: abril de 2020]. Disponible en: [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/BIOD\\_ConservacaoID-eWNPNpKEJw.pdf](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/BIOD_ConservacaoID-eWNPNpKEJw.pdf)
- Gopikrishnan, V., Radhakrishnan, M., Pazhanimurugan, R., Shanmugasundaram, T. y Balagurunathan, R., 2015. Bioprospecting of actinobacteria from mangrove and estuarine sediments for antifouling compounds [En línea]. En: *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(7), pp.1144–1153. [Consulta: abril de 2020]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/287509924\\_Bioprospecting\\_of\\_marine\\_derived\\_actinomycetes\\_with\\_special\\_reference\\_to\\_antimycobacteriactivity](https://www.researchgate.net/publication/287509924_Bioprospecting_of_marine_derived_actinomycetes_with_special_reference_to_antimycobacteriactivity)
- Goransson, U., Sjogren, M., Svargard, E., Claeson, P. y Bohlin, L., 2004. Reversible antifouling effect of the cyclotide cycloviolacin O2 against barnacles. En: *Journal of Natural Products*, 67, pp.1287–1290. <https://doi.org/10.1021/np0499719>
- Gupta, R.S., 2000. The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. En: *FEMS Microbiology Reviews*, 24, pp.367–402. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00547.x>
- Hagerman, A.E. y Butler, L.G., 1989. Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin [En línea]. En: *Journal of Chemical Ecology*, 15, pp.1795–1810. [Consulta: abril de 2020]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01012267>
- Hammer, Ø. y Harper, D.A.T., 2006. *Paleontological Data. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis* [En línea]. Version 2.17c. [s.l]: [s.n.]. [Consulta: abril de 2020]. Disponible en: [http://priede.bf.lu.lv/ftp/pub/TIS/datu\\_analize/PAST/2.17c/download.html](http://priede.bf.lu.lv/ftp/pub/TIS/datu_analize/PAST/2.17c/download.html)
- Huang, X-Z., Xu, Y., Zhang, Y-F., Zhang, Y., Wong, H., Han, Z., Yin, Y. y Qian, P-Y., 2014. Nontoxic piperamides and their synthetic analogues as novel antifouling reagentes. En: *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 30(4), pp.473-481. <https://doi.org/10.1080/08927014.2014.889688>
- Holtum, R.E., 1950. The Zingiberaceae of the Malay peninsula. En: *The Gardens' Bulletin, Singapore*, 13(4), pp.1-50.

- Jenkins, S.R. y Martins, G.M., 2010. *Succession on hard substrata*. En: Durr, S. y Thomason, J.C., eds. *Biofouling*. Oxford: Wiley. 456 p.
- Karasawa, M.M.G. y Mohan, C., 2018. Fruits as prospective reserves of bioactive compounds: a review. En: *Natural Products and Bioprospecting*, 8, pp.335–346. <https://doi.org/10.1007/s13659-018-0186-6>
- Katsuyama, I., Satuito, C.G., Maeda, T., Oonishi, M. y Kumagai, T., 2005. The effect of DC-pulse electric stimulus on the swimming behavior of larvae of the freshwater mussel *Limnoperna fortunei* in flowing water within a pipe. En: *Sessile Organisms*, 2, pp.1–5. <https://doi.org/10.4282/sosj.22.1>
- Kothari, V. y Seshadri, S., 2010. Antioxidant activity of seed extracts of *Annona squamosa* and *Carica papaya*. En: *Nutrition & Food Science*, 40(4), pp.403–408. <https://doi.org/10.1108/00346651011062050>
- Konstantinou, I.K. y Albanis, T.A., 2004. Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. En: *Environment International*, 30, pp.235–248. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00176-4](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00176-4)
- Leary, D.H., Li, R.W., Hamdan, L.J., Hervey, I.V.W.J., Lebedev, N., Wang, Z., Deschamps, J.R., Kusterbeck, A.W. y Vora, G.J., 2014. Integrated metagenomic and metaproteomic analyses of marine biofilm communities. En: *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 30(10), pp.1211–1223. <https://doi.org/10.1080/08927014.2014.977267>
- Lee, J.W., Nam, J.H., Kim, Y.H., Lee, K.H. y Lee, D.H., 2008. Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artificial surfaces. En: *Journal of Microbiology*, 46(2), pp.174–182. <https://doi.org/10.1007/s12275-008-0032-3>
- Liu, R.H., 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. En: *The Journal of Nutrition*, 134(12), pp.3479S–3485S. <https://doi.org/10.1093/jn/134.12.3479S>
- Liu, Y., Shao, X., Huang, J. y Li, H., 2019. Flame sprayed environmentally friendly high-density polyethylene. En: *Hydrobiologia*, 847, pp.45–60. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.11.144>
- Macedo, A.J. y Abraham, W.R., 2009. Can infectious biofilm be controlled by blocking bacterial communication? En: *Journal of Medicinal Chemistry*, 5(6), pp.517–528. <https://doi.org/10.2174/157340609790170515>

- Malafaia, C.B., Jardelino, A.C.S., Silva, A.G.S., Souza, E.B., Macedo, A.J., Correia, M.T.S. y Silva, M.V., 2017. Effects of Caatinga plant extracts in planktonic growth and biofilm formation in *Ralstonia solanacearum*. En: *Microbial Ecology*, 75(3), pp.555–561. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1073-0>
- Manilal, A., Sujith, S., Sabarathnam, B., Seghal Kiran, G., Selvin, J., Shakir, C. y Lipton, A.P., 2010. Antifouling potentials of seaweeds collected from the Southwest Coast of India [En línea]. En: *World Journal of Agricultural Sciences*, 6(3), pp.243–248. [Consulta: abril de 2020]. Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.415.4820&rep=rep1&type=p>
- Maranhão, R.A. y Stori, N., 2019. Estratégias de gestão ambiental adotadas pelo setor elétrico para controle do *Limnoperna fortunei* [En línea]. En: *Brazilian Journal of Business*, 1(4), pp.1605-1613. [Consulta: abril de 2020]. Disponible en: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BJB/article/view/4223/0>
- Maréchal, J-F. y Hellio, C., 2009. Challenges for the development of new non-toxic antifouling challenges for the development of new nontoxic antifouling solutions. En: *International Journal of Molecular Sciences*, 10, pp.4623–4637. <https://doi.org/10.3390/ijms10114623>
- Medeiros-Costa, J.T., 2002. *As espécies de plameiras (Arecaceae) do Estado de Pernambuco, Brasil*. En: Tabarelli, M. y Silva, J.M.C, orgs. Diagnostico da biodiversidade de Pernambuco. v.1. Recife: SECTMA & Massangana. pp.229-236
- Moodie, L.W.K., Cervin, G., Trepos, R., Labriere, C., Hellio, C., Pavia, H. y Svenson, J., 2018. Design and biological evaluation of antifouling dihydrostilbene oxime hybrids. En: *Marine Biotechnology*, 20(2), pp.257–267. <https://doi.org/10.1007/s10126-018-9802-z>
- Muthusamy, S., Lundin, D., Branca, R.M.M.M., Baltar, F., Gonzalez, J.M., Lehtio, J. y Pinhassi, J., 2017. Comparative proteomics reveals signature metabolisms of exponentially growing and stationary phase marine bacteria. En: *Environmental Microbiology*, 19(6), pp.2301–2319. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13725>
- Nandakumar, K. y Yano, T., 2003. Biofouling and its prevention: a comprehensive overview. En: *Biocontrol Science*, 8(4), pp.133–144. <https://doi.org/10.4265/bio.8.133>

- Nadir, I., Rana, N.F., Ahmad, N.M., Tanweer, T., Batool, A., Taimoor, Z., Riaz, S. y Ali, S.M., 2020. Cannabinoids and terpenes as an antibacterial and antibiofouling promotor for PES water filtration membranes. En: *Molecules*, 25(3), pp.691. <https://doi.org/10.3390/molecules25030691>
- Nandhini, S. y Revathi, K., 2016. Antifouling activity of extracts from mangroves against biofouling bacteria isolated from boats in Royapuram, Chennai, India. En: *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(8), pp.324-335. <https://doi.org/10.20546/IJCMAS.2016.508.035>
- Omae, I., 2003. General aspects of tin-free antifouling paints. En: *Chemical Reviews*, 103, pp.3431-3448. <https://doi.org/10.1021/cr030669z>
- Pancharoen, O., Prawat, U. y Tuntiwachwuttikul, P., 2000. Phytochemistry of the zingiberaceae. En: *Studies in Natural Products Chemistry*, 23, pp.797-865. [https://doi.org/10.1016/s1572-5995\(00\)80142-8](https://doi.org/10.1016/s1572-5995(00)80142-8)
- Pell, S.K.; Mitchell, J.D., Miller, A.J. y Lobova, T.A., 2011. Anacardiaceae. En: Kubtzkiĭ, K., ed. *The families and genera of vascular plants. Flowering plants, Eudicots - Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae. V.10*. Berlin: Springer Verlag. pp.7-50.
- Pérez, M., García, M., Blustein, G. y Stupak, M., 2007. Tannin and tannate from the quebracho tree: an eco-friendly alternative for controlling marine biofouling. En: *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 23(3), pp.151-159. <https://doi.org/10.1080/08927010701189484>
- Pérez, M., García, M., Sánchez, M., Stupak, M., Mazzuca, M., Palermo, J.A. y Blustein, G., 2014. Effect of secochiliolide acid isolated from the Patagonian shrub *Nardophyllumbryoides* as active component in antifouling paints. En: *International Biodeterioration & Biodegradation*, 89, pp.37e44. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.01.009>
- Pichlmaier, M., Marwitz, V., Kühn, C., Niehaus, M., Klein, G., Bara, C., Haverich, A. y Abraham, W.-R., 2008. High prevalence of asymptomatic bacterial colonization of rhythm management devices. En: *Europace*, 10, pp.1067-1072. <https://doi.org/10.1093/europace/eun191>
- Prabhakaran, S., Rajaram, R., Balasubramanian, V. y Mathivanan, K., 2012. Antifouling potentials of extracts from seaweeds, seagrasses and mangroves against primary biofilm forming bacteria. En: *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(1), pp.S316-S322. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60181-6](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60181-6)

- Qian, P.-Y., Xu, Y. y Fusetani, N., 2010. Natural products as antifouling compounds: recente progress and future perspectives. En: *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 26(2), pp.223-234. <https://doi.org/10.1080/08927010903470815>
- Ralston, E. y Swain, G., 2009. Bioinspiration—the solution for biofouling control? En: *Bioinspiration and Biomimetics*, 4, pp.015007. <https://doi.org/10.1088/1748-3182/4/1/015007>
- Raven, P.H., Evert, R.F. y Eichhorn, S.E., 1992. *Biologiavegetal*. 5a ed. Nueva York: Worth Publishers. 876 p.
- Salta, M., Wharton, J.A., Dennington, S.P., Stoodley, P. y Stokes, K.R., 2013. Anti-biofilm performance of three natural products against initial bacterial attachment. En: *International Journal of Molecular Sciences*, 14(11), pp.21757–21780. <https://doi.org/10.3390/ijms141121757>
- Sandjo, L.P., Kuete, V., Tchangna, R.S., Efferth, T. y Ngadjui, B.T., 2014. Cytotoxic Benzophenanthridine and Furoquinoline Alkaloids from *Zanthoxylum buesgenii* (Rutaceae). En: *Chemistry Central Journal*, 8(61), pp.4. <https://doi.org/10.1186/s13065-014-0061-4>
- Santos, C.P., Vicenzi, J., Berutti, F.A., Mansur, M.C.D., Pérez Bergmann, C., Raya Rodriguez, M.T., Vilar Nehrke, M. y Leite Zurita, M.L., 2012. Controle de bivalves com a utilização do ultrassom. En: Mansur, M.C.D., Santos, C.P., Pereira, D., Padula, P.I.C., Leite, Z.M.L., Raya, R.M.T., Vilar, N.M. y Aydos, B.P.E., eds. *Moluscos límnicos invasores no Brasil. Biologia, prevenção, controle*. Porto Alegre: Redes Editora. pp.339–341.
- Schultz, M.P., Bendick, J.A., Holm, E.R. y Hertel, W.M., 2011. Economic impact of biofouling on a naval surface ship. En: *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 27(1), pp.87–98. <https://doi.org/10.1080/08927014.2010.542809>
- Sichaem, J., Jirasirichote, A., Sapasuntikul, K., Khumkratok, S., Sawasdee, P., Do, T.M.L. y Tip-pyang, S., 2014. New furoquinoline alkaloids from the leaves of *Evodia lepta*. En: *Fitoterapia*, 92, pp.270–273. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.12.002>
- Soroldoni, S., Abreu, F., Castro, I.B., Duarte, F.A. y Pinho, G.L.L., 2017. Are antifouling paint particles a continuous source of toxic chemicals to the marine environment? En: *Journal of Hazardous Materials*, 15(330), pp.76–82. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.02.001>

- Stupak, M.E., García, M.T. y Pérez, M.C., 2003. Non-toxic alternative compounds for marine antifouling paints. En: *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52, pp.49-52. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(03\)00035-0](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00035-0)
- Takasawa, R., Etoh, H., Yagi, A., Sakata, K. e Ina, K., 1990. Nonylphenols as promising antifouling agents found by a simple bioassay method using the blue mussel, *Mytilus edulis*. En: *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(6), pp.1607-1610. <https://doi.org/10.1080/00021369.1990.10870144>
- Teixeira, V.L, 2010. *Caracterização do estado da arte em biotecnologia marinha no Brasil* [En línea]. Brasilia: Ministério da Saúde, Organização Panamericana da Saúde. Ministério da Ciência e Tecnologia. (Série B. Textos Básicos de Saúde). 134p. [Consulta: abril de 2020]. Disponible en: <http://www.terrabrasil.org.br/ecotecadigital/index.php/estantes/pesquisa/1731-caracterizacao-do-estado-da-arte-em-biotecnologia-marinha-no-brasil>
- Telegdi, J., Trif, L. y Romanszki, L., 2016. Smart anti-biofouling composite coatings for naval applications. En: Montemor, M.F., ed. *Transport, structural, environmental and energy applications*. Cambridge: Elsevier. (Woodhead Publishing Series in Composites Science and Engineering). <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-283-9.00005-1>
- Trentin, D.S., Giordani, R.B., Zimmer, K.R., Silva, A.G., Silva, M.V., Correia, M.T.S., Baumvol, I.J.R. y Macedo, A.J., 2011. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. En: *Journal of Ethnopharmacology*, 137, pp.327–335. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.05.030>
- Uliano-Silva, M., Dondero, F., Dan Otto, T., Costa, I., Lima, N.C.B., Americo, J.A., Mazzoni, C.J., Prosdocimi, F. y Rebelo, M.F., 2018. A hybrid-hierarchical genome assembly strategy to sequence the invasive golden mussel, *Limnoperna fortunei*. En: *Giga Science*, 7. <https://doi.org/10.1093/gigascience/gix128>
- WHOI, Woods Hole Oceanographic Institution, 1952. *Marine fouling and its prevention* [En línea]. Annapolis: US Naval Institute. [Consulta: abril de 2020]. Disponible en: <https://darchive.mblwhoilibrary.org/handle/1912/191>
- Williams, C.A. y Grayer, R.J., 2004. Anthocyanins and other flavonoids. En: *Natural Product Reports*, 21, pp.539–573. <https://doi.org/10.1039/b311404j>



Xu, Q., Barrios, C.A., Cutright, T. y Newby, B.Z., 2005. Evaluation of toxicity of capsaicin and zosteric acid and their potential application as antifoulants. En: *Environmental Toxicology*, 20(5), pp.467-74.  
<https://doi.org/10.1002/tox.20134>

Zhou, X., Zhang, Z., Xu, Y., Jin, C., He, H., Hao, X. y Qian, P.-Y., 2009. Flavone and isoflavone derivatives of terrestrial plants as larval settlement inhibitors of the barnacle *Balanus amphitrite*. En: *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 25(1), pp.69–76.  
<https://doi.org/10.1080/08927010802455941>

## ANEXOS

### Anexo 1. Tratamientos probados con resultados satisfactorios sobre el uso de productos naturales de plantas terrestres como posible antiincrustante.

\*probados con microfouling, \*\*probados con macrofouling, \*\*\*probados con micro y macrofouling.

| Familia        | Especies                         | Parte de la planta | Compuesto              | Molécula  | Autor                     |
|----------------|----------------------------------|--------------------|------------------------|---|---------------------------|
| Acanthaceae    | <i>Harpochilus neesianus</i>     | mezcla             |                        |   | Agostini, et al. (2020)*  |
|                | <i>Myracrodruonurum deuva</i>    | hojas              |                        |   |                           |
|                | <i>Schinopsi</i> ssp.            | no informada       | tanino                 |   | Pérez, et al. (2007)**    |
|                |                                  |                    | tanino                 |   |                           |
| Anacardiaceae  |                                  |                    | tanino                 |   | Bellotti, et al. (2014)** |
|                | no informada                     | no informada       | tanino                 |   | Qian, et al. (2010)***    |
|                |                                  |                    | tanino                 |   | Stupak, et al. (2003)**   |
| Apiaceae       | <i>Apium graveolens</i>          | no informada       | flavonoide             | Apigenina (C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> )       | Zhou, et al. (2009)**     |
|                | <i>Acrocomiatotai</i>            | semillas           |                        |   |                           |
|                | <i>Archontophoenix myolensis</i> | semillas           |                        |   |                           |
| Arecaceae      | <i>Coccothrinax borhidiana</i>   | semillas           |                        |   | Clasen y Kesel (2019)**   |
|                | <i>Dypsis paludosa</i>           | semillas           |                        |   |                           |
|                | <i>Licuala spinosa</i>           | semillas           |                        |   |                           |
|                | <i>Nardophyllum bryoides</i>     | aérea              | ácido secocoliolide    |   | Pérez, et al. (2014)***   |
| Cannabaceae    | <i>Cannabis sativa</i>           | no informada       | cannabinoide + terpeno |   | Nadir, et al. (2020)*     |
| Combretaceae   | <i>Combretum caffrum</i>         | no informada       | terpeno                | Sesquiterpeno (C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> NaO <sub>4</sub> ) | Moodie, et al. (2018)*    |
| Convolvulaceae | <i>Ipomoea alba</i>              | semillas           |                        |   | Clasen y Kesel (2019)**   |
|                | <i>Anadenanthera</i>             | frutas             |                        |   | Agostini, et al. (2019)*  |
|                | <i>Apuleia leiocarpa</i>         | hojas              |                        |   |                           |
|                | <i>Arachis hypogaea</i>          | no informada       | flavonoide             | Luteolina (C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub> )       | Zhou, et al. (2009)**     |
|                | <i>Dioclea grandiflora</i>       | hojas              |                        |   | Agostini, et al. (2019)*  |
|                | <i>Erythrina berteroaana</i>     | semillas           |                        |   | Clasen y Kesel (2019)**   |
| Fabaceae       | <i>Genista tinctoria</i>         | no informada       | flavonoide             | Genistein (C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> )       | Zhou, et al. (2009)**     |

Continúa

| Familia        | Especies                        | Parte de la planta | Compuesto    | Molécula  | Autor  |
|----------------|---------------------------------|--------------------|--------------|---|--|
|                | <i>Myroxyton peruiferum</i>     | hojas              |              |   | Agostini, et al. (2019)*                       |
|                |                                 | frutas             | flavonoide   | Metoxkurarinona (20-methoxykurarinone)  | Feng, et al. (2009)**                          |
|                | <i>Sophora flavescens</i>       |                    | flavonoide   | 2'-methoxykurarinone matrine  | Qian, et al. (2010)***                         |
|                |                                 | no informada       |              |   |  |
|                |                                 |                    | tanino       |   | Stupak, et al. (2003)**                        |
| Fagaceae       | <i>Quercus dentata</i>          | hojas              | flavonoide   | Glucósido de kaempferolacilado (kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-(2'',3''-di E- p-coumaroyl)-rhamnoside) | Takasawa, et al. (1990)**                      |
|                | no informada                    | no informada       | tanino       |   | Stupak, et al. (2003)**                        |
| Juglandaceae   | <i>Juglans nigra</i>            | mezcla             | juglone      | Juglone (C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> )   | Salta, et al. (2013)*                          |
| Menispermaceae | <i>Stephania cepharantha</i>    | no informada       | alcaloide    | Cepharanthine (C <sub>37</sub> H <sub>38</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> )                      | Feng, et al. (2018)**                          |
|                | <i>Stephania tetrandra</i>      |                    | alcaloide    | Tetrandrina (C <sub>38</sub> H <sub>42</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> )                        |  |
| Myrtaceae      | <i>Eucalyptus rubida</i>        | hojas              | estilbenoide | Raponticinaacilada (C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub> )                                | Takasawa, et al. (1990)**                      |
| Nyssaceae      | <i>Camptotheca acuminata</i>    |                    | alcaloide    | Camptotecina (C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )                       | Feng, et al. (2018)**                          |
| Papaveraceae   | <i>Dicentra spectabilis</i>     | no informada       | alcaloide    | Dicentra (C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub> )   |  |
| Pinaceae       | <i>Pinus armandii</i>           |                    |              |   | C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> O <sub>2</sub> |
| Piperaceae     | <i>Piper betle</i>              |                    | alcaloide    | Piperoleina B (C <sub>21</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub> )                                    | Huang, et al. (2014)**                         |
| Rhizophoraceae | <i>Bruguiera cylindrica</i>     | hojas              |              |   | Nandhini y Revathi (2016)*                     |
|                | <i>Rhizophora apiculata</i>     | hojas              |              |   |  |
| Rutaceae       | <i>Micromelum integerrimum</i>  | no informada       | flavonoide   | Calicopterina (C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub> )                                     | Zhou, et al. (2009)**                          |
|                |                                 |                    | flavonoide   | Casticina (C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub> )   |  |
|                |                                 |                    | flavonoide   | 5,40-dihydroxy-3,6,7-trimethoxy flavone   |  |
| Sapindaceae    | <i>Sapindus saponaria</i>       | semillas           |              |   | Clasen y Kesel (2019)**                        |
| Sapotaceae     | <i>Manilka rarufula</i>         | hojas              |              |   | Agostini, et al. (2020)*                       |
|                | <i>Sideroxylon obtusifolium</i> | corteza de tallo   |              |   |  |
| Solanaceae     | <i>Nicotiana longiflora</i>     | mezcla             |              |   | Bogdan, et al. (2018)**                        |
| Turneraceae    | <i>Turnera hermantioides</i>    | hojas              |              |   | Agostini, et al. (2020)*                       |

Continúa

| Familia       | Especies                    | Parte de la planta | Compuesto       | Molécula  | Autor                      |
|---------------|-----------------------------|--------------------|-----------------|---|----------------------------|
| Violaceae     | <i>Viola odorata</i>        |                    | ciclotida       | Cicloviolacina O <sub>2</sub>   | Goransson, et al. (2004)** |
|               | <i>Eucalyptus</i> spp.      | no informada       |                 |   |                            |
| Zingiberaceae | <i>Tasmannia lanceolata</i> |                    | terpeno         | Sesquiterpeno (C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> NaO <sub>4</sub> )                 | Etoh, et al. (2002)**      |
|               | <i>Zingiber officinale</i>  | raíces             | fenole          | Shogaol (Trans-8-shogaol)   |                            |
|               |                             |                    | alcaloide       | Capsaicina (C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub> )                     |                            |
|               |                             |                    | flavonoide      | Penduletina (5,4'-dihydroxy-3,6,7-trimethoxy flavone)                             | Cui, et al. (2014)**       |
|               |                             |                    | alcaloide       | Capsaicina (8-methyl-N-vanillyl-trans-6-nonenamide)                               | Angarano, et al. (2007)**  |
|               |                             |                    | ciclotida       | Cycloviolacin O <sub>2</sub>  |                            |
|               |                             |                    | alcaloide       | Capsaicina (C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub> )                     |                            |
|               |                             |                    | alcaloide       | Capsaicina (N-vanillynonamide (C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub> )) |                            |
| no informada  | no informada                | no informada       | ácido graso     | Anandamida (C <sub>22</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>2</sub> )                     | Qian, et al. (2010)***     |
|               |                             |                    | flavonoide      | Genistein (C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> )                       |                            |
|               |                             |                    | tanino          |   |                            |
|               |                             |                    | isotiocianato   | 6-Methylthiohexyl isothiocyanate (C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> ) | Takasawa, et al. (1990)**  |
|               |                             |                    | alcaloide       | Capsaicina (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide)                                     |                            |
|               |                             |                    | ácido zosterico | p-(sulfooxy) cinnamicacid   | Xu, et al. (2005)*         |

\*La información bibliográfica completa se puede encontrar en el documento principal

## Anexo 2. Lista de organismos inhibidos por la acción de extractos compuestos o por moléculas derivadas de plantas terrestres.

| Microfouling |                |                     |                    |                        |                          |
|--------------|----------------|---------------------|--------------------|------------------------|--------------------------|
| Reino        | Filo           | Clase               | Orden              | Familia                | Género                   |
| Bacteria     | Actinobacteria | Actinobacteria      | Actinomycetales    | Micrococcaceae         | <i>Micrococcus</i>       |
| Bacteria     | Bacteroidetes  | Flavobacteria       | Flavobacteriales   | Flavobacteriaceae      | <i>Polaribacter</i>      |
| Bacteria     | Firmicutes     | Bacilli             | Bacillales         | Bacillaceae            | <i>Bacillus</i>          |
| Bacteria     | Firmicutes     | Bacilli             | Bacillales         | Bacillaceae            | <i>Exiguobacterium</i>   |
| Bacteria     | Firmicutes     | Bacilli             | Lactobacillales    | Enterococcaceae        | <i>Enterococcus</i>      |
| Bacteria     | Firmicutes     | Bacilli             | Bacillales         | Staphylococcaceae      | <i>Staphylococcus</i>    |
| Bacteria     | Firmicutes     | Bacilli             | Bacillales         | Staphylococcaceae      | <i>Salinicoccus</i>      |
| Bacteria     | Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Rhodobacterales    | Rhodobacteraceae       | <i>Phaeobacter</i>       |
| Bacteria     | Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Rhodobacterales    | Rhodobacteraceae       | <i>Roseobacter</i>       |
| Bacteria     | Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Alteromonadales    | Alteromonadaceae       | <i>Alteromonas</i>       |
| Bacteria     | Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Alteromonadales    | Alteromonadaceae       | <i>Marinobacter</i>      |
| Bacteria     | Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Alteromonadales    | Pseudoalteromonadaceae | <i>Pseudoalteromonas</i> |
| Bacteria     | Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Alteromonadales    | Pseudomonadaceae       | <i>Pseudomonas</i>       |
| Bacteria     | Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Alteromonadales    | Shewanellaceae         | <i>Shewanella</i>        |
| Bacteria     | Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Oceanospirillales  | Halomonadaceae         | <i>Cobetia</i>           |
| Bacteria     | Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Enterobacteriales  | Enterobacteriaceae     | <i>Escherichia</i>       |
| Bacteria     | Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Enterobacteriales  | Enterobacteriaceae     | <i>Salmonella</i>        |
| Bacteria     | Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Oceanospirillales  | Halomonadaceae         | <i>Halomonas</i>         |
| Bacteria     | Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Oceanospirillales  | Oceanospirillaceae     | <i>Marinomonas</i>       |
| Bacteria     | Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Oceanospirillales  | Oceanospirillaceae     | <i>Neptuniibacter</i>    |
| Bacteria     | Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Oceanospirillales  | Oceanospirillaceae     | <i>Oceanospirillum</i>   |
| Bacteria     | Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Oceanospirillales  | Oceanospirillaceae     | <i>Oleibacter</i>        |
| Bacteria     | Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Thiotrichales      | Piscirickettsiaceae    | <i>Methylophaga</i>      |
| Bacteria     | Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Vibrionales        | Vibrionaceae           | <i>Vibrio</i>            |
| Chromista    | Haptophyta     | Prymnesiophyceae    | Isochrysidales     | Isochrysidaceae        | <i>Chrysothila</i>       |
| Chromista    | Ochrophyta     | Bacillariophyceae   | Bacillariales      | Bacillariaceae         | <i>Cylindrotheca</i>     |
| Chromista    | Ochrophyta     | Bacillariophyceae   | Bacillariales      | Bacillariaceae         | <i>Nitzschia</i>         |
| Chromista    | Ochrophyta     | Bacillariophyceae   | Melosirales        | Melosiraceae           | <i>Melosira</i>          |
| Chromista    | Ochrophyta     | Bacillariophyceae   | Naviculales        | Amphipleuraceae        | <i>Halamphora</i>        |
| Chromista    | Ochrophyta     | Bacillariophyceae   | Naviculales        | Naviculaceae           | <i>Navicula</i>          |
| Chromista    | Ochrophyta     | Bacillariophyceae   | Naviculales        | Pleurosigmataceae      | <i>Pleurosigma</i>       |
| Chromista    | Ochrophyta     | Bacillariophyceae   | Striatellales      | Striatellaceae         | <i>Grammatophora</i>     |
| Chromista    | Ochrophyta     | Bacillariophyceae   | Thalassiosiphales  | Catenulaceae           | <i>Amphora</i>           |
| Chromista    | Ochrophyta     | Bacillariophyceae   | Thalassionematales | Thalassionemataceae    | <i>Thalassiothrix</i>    |
| Plantae      | Rhodophyta     | Porphyridiophyceae  | Porphyridiales     | Porphyridiaceae        | <i>Porphyridium</i>      |

| Macrofouling |             |              |                 |               |                      |
|--------------|-------------|--------------|-----------------|---------------|----------------------|
| Reino        | Filo        | Clase        | Orden           | Familia       | Género               |
| Chromista    | Ochrophyta  | Phaeophyceae | Ectocarpales    | Ectocarpaceae | <i>Ectocarpus</i>    |
| Plantae      | Chlorophyta | Ulvophyceae  | Ulvales         | Ulvaceae      | <i>Ulva</i>          |
| Animalia     | Annelida    | Polychaeta   | Sabellida       | Serpulidae    | <i>Hydroides</i>     |
| Animalia     | Annelida    | Polychaeta   | Sabellida       | Serpulidae    | <i>Neodexiospira</i> |
| Animalia     | Annelida    | Polychaeta   | Spionida        | Spionidae     | <i>Boccardia</i>     |
| Animalia     | Arthropoda  | Hexanauplia  | Sessilia        | Balanidae     | <i>Amphibalanus</i>  |
| Animalia     | Arthropoda  | Hexanauplia  | Sessilia        | Balanidae     | <i>Chthamalus</i>    |
| Animalia     | Arthropoda  | Malacostraca | Amphipoda       | Corophiidae   | <i>Corophium</i>     |
| Animalia     | Bryozoa     | Gymnolaemata | Cheilostomatida | Bugulidae     | <i>Bugula</i>        |
| Animalia     | Chordata    | Ascidacea    | Phlebobranchia  | Cionidae      | <i>Ciona</i>         |
| Animalia     | Mollusca    | Bivalvia     | Myida           | Dreissenidae  | <i>Dreissena</i>     |
| Animalia     | Mollusca    | Bivalvia     | Mytilida        | Mytilidae     | <i>Mytilus</i>       |
| Animalia     | Mollusca    | Bivalvia     | Ostreida        | Ostreidae     | <i>Crassostrea</i>   |



Revisiones

## **Control del agua de lastre como fuente de ingreso de especies exóticas invasoras en puertos argentinos de la Cuenca del Plata**

### **Control of ballast water as a source of invasive exotic species in Argentine ports of the River Plate Basin**

### **Controle da água de lastro como fonte de entrada de espécies exóticas invasoras nos portos argentinos da Bacia do Prata**

**Mariana Inés Abelando**<sup>1, 2 \*</sup> <https://orcid.org/0000-0003-4112-714X>

\*Autor de contacto: [mariana.ines.abelando@gmail.com](mailto:mariana.ines.abelando@gmail.com)

<sup>1</sup>Prefectura Naval Argentina, Dirección de Protección Ambiental. Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup>Instituto Universitario de Seguridad Marítima. Buenos Aires, Argentina.

**Recepción:** 24 Agosto 2020 **Aprobación:** 21 Octubre 2021

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución NoComercial 4.0 Internacional.

**Resumen:** Gracias al avance tecnológico, la frecuencia de los viajes transoceánicos ha aumentado; y de manera involuntaria, también el transporte de especies de una región a otra, quebrantando barreras naturales. Cuando estas especies se convierten en invasoras, suelen generar graves impactos en la biodiversidad, la economía y la salud pública. Este estudio analiza la gestión del agua de lastre en los puertos argentinos situados en la Cuenca del Plata, basándose en datos publicados e inéditos acerca del cumplimiento de la normativa nacional e internacional, análisis de riesgo, tendencias y experiencias en otros países de la región. Luego de casi una década de trabajo, Argentina ha logrado un cumplimiento efectivo de la normativa vigente por parte de la flota mercante, lo que se ha visto reflejado en la ausencia de nuevas especies invasoras en la región. Los esfuerzos futuros para reducir los impactos de la invasión deben considerar la optimización de recursos e incorporar nuevas metodologías en el control del agua de lastre, particularmente la Regla D-2, así como también considerar las bioincrustaciones como otro vector de importancia.

**Palabras clave:** Argentina, bioinvasiones, BWM 04, control, salinidad.

**Abstract:** Thanks to the technological advances, the frequency of transoceanic voyages has increased and, in an involuntary way, the transport of species from one region to another, breaking natural barriers. When these species become invasive, they usually have serious impacts on biodiversity, the economy and public health. This study analyzes the ballast water management in Argentine ports located in the Del Plata Basin, based on published and unpublished data on compliance with the national and international regulations, risk analysis, trends and experiences in other countries of the region. After almost a decade, Argentina has achieved an effective compliance of the rules in force by its merchant fleet, what has been reflected in the absence of new invasive species in the region. Future efforts to reduce the impacts of invasions should consider the optimization of resources and the incorporation of new technologies for ballast water control, particularly Regulation D-2, and they should also consider biofouling as another vector of importance.

**Keywords:** Argentina, bioinvasions, BWM 04, control, salinity.

**Resumo:** Graças ao avanço tecnológico, a frequência das viagens transoceânicas aumentado e, involuntariamente o transporte de espécies de uma região a outra, quebrantando barreiras naturais. Quando essas espécies tornam-se invasoras, muitas vezes têm sérios impactos sobre a biodiversidade, a economia e a saúde pública. Este estudo analisa na gestão da água de lastro nos portos argentinos situados na Bacia do Prata, com base em dados publicados e dados inéditos acerca do cumprimento das regulamentações nacionais e internacionais, a análise do risco, as tendências e experiências em outros países da região. Depois de quase uma década de trabalho, a Argentina tem assegurado o cumprimento efetivo das regulamentações vigentes pela frota mercante, o que foi refletido na ausência de novas espécies invasoras na região. Os esforços futuros para reduzir os impactos da invasão devem considerar a otimização de recursos e incorporar novas metodologias ao controle de água de lastro, particularmente a Regra D-2, assim como devem considerar as bioincrustações como outro vetor de importância.

**Palavras-chave:** Argentina, bioinvasões, BWM 04, controle, salinidade.

## INTRODUCCIÓN

Las especies nativas o autóctonas comprenden desde microorganismos hasta plantas y animales superiores; son características de cada ecosistema y rara vez suelen traspasar sus límites naturales de distribución, siendo las corrientes oceánicas, las aves y los peces quienes contribuyen en su dispersión natural. A lo largo de los años, los seres humanos han estado movilizand o organismos de un lugar a otro del planeta, atravesando océanos y quebrantando barreras biogeográficas naturales (Schwindt, et al., 2018). Muchas de estas especies han sido capaces de establecer nuevas poblaciones fuera de sus límites naturales y amenazar a las especies nativas, causar daños ecológicos y hasta convertirse en una amenaza para la salud y la economía de las poblaciones, por lo que se catalogan bajo el término de invasoras (Carlton, 1996, Pimentel, et al., 2005). Estas incursiones han mostrado un importante incremento en su frecuencia, extensión y daño a lo largo del tiempo, y existen evidencias de que esta tendencia continuará si no se actúa en consecuencia (Schwindt, et al., 2020).

El transporte de especies invasoras está a menudo, pero no exclusivamente, asociado con el transporte de actividades comerciales de los buques (por ejemplo, incrustaciones en el casco y/o en el lastre húmedo y seco), convirtiendo a los entornos portuarios en sitios de ingreso para las invasiones biológicas. En la actualidad, el 90% del comercio global ocurre a través de barcos que, advertida e inadvertidamente, transportan especies acuáticas de una región a otra (Organización Marítima Internacional, 2004).

Las primeras embarcaciones, cuyos cascos eran de madera, utilizaban rocas y arena (lastre seco) para mantener su estabilidad y equilibrio; y entre éstas viajaban de forma involuntaria cientos de pequeños mamíferos, aves, plantas, insectos y semillas. Asimismo, el exterior de los barcos se encontraba colonizado por organismos marinos como algas, moluscos y crustáceos, entre otros. A partir de 1890, con la modernización de la industria naval y la utilización de acero para la construcción de buques, el lastre seco fue reemplazado por tanques especialmente diseñados para contener agua. Con este avance, las embarcaciones comenzaron a ser más veloces y les permitió visitar mayor número de puertos en el mundo (GEF, et al., 2007).

El agua de lastre es esencial para la seguridad y operación eficiente de los buques ya que provee balance, estabilidad, maniobrabilidad y eficacia de propulsión a los

barcos sin carga (Gollasch, et al., 2007; GEF, et al., 2007). Cuando un buque carga agua de lastre, lo hace junto con los organismos que habitan el lugar, tanto planctónicos como bentónicos y nectónicos, y muy frecuentemente también incorpora sedimentos. Aunque no todos estos organismos sobrevivirán en el tanque de agua de lastre, dado que es un medio hostil con bastante movimiento, falta de alimento y luz; algunos lo hacen, tanto en su forma vegetativa como en forma de huevos, quistes o estadios de resistencia. Esos sobrevivientes, al ser descargados junto al agua de lastre en un puerto diferente al de origen, podrían generar consecuencias desastrosas para el ecosistema local.

Debido a la magnitud e intensidad del impacto generado por las especies exóticas invasoras en todo el mundo, la Organización Marítima Internacional (OMI) ha adoptado diferentes medidas dirigidas al control y manejo del agua de lastre. En 1997, la OMI elaboró y publicó las "Directrices para el control y la gestión del agua de lastre de los buques a fin de reducir al mínimo la transferencia de organismos acuáticos perjudiciales y agentes patógenos" (Organización Marítima Internacional, 1997). Posteriormente, elaboró un instrumento jurídico internacional: el "Convenio internacional para el control y la gestión del agua de lastre y los sedimentos de los buques" (Ballast Water Management, por sus siglas en inglés, BWM 04) (Organización Marítima Internacional, 2004), que entró en vigencia en setiembre de 2017.

En 1998, la República Argentina se convirtió en el país pionero de Sudamérica en prevenir la introducción de especies exóticas invasoras. A través de su autoridad marítima, la Prefectura Naval Argentina (PNA), se dictó la Ordenanza N° 7/98 (DPAM) "Prevención de la contaminación con organismos acuáticos en el lastre de barcos destinados a puertos argentinos en la Cuenca del Plata", basado en Directrices de la OMI (Argentina. Prefectura Naval Argentina, 1998). Esta ordenanza establecía que todos los buques oceánicos con destino a puertos argentinos, que provengan de puertos extranjeros y que lleven agua de lastre a bordo, debían intercambiarla antes de ingresar a las vías fluviales nacionales. Esto se debe a que el intercambio físico de agua de lastre en altamar reduce drásticamente el riesgo de invasión de invertebrados de agua dulce, principalmente debido al choque de salinidad que sufren los organismos que permanecen en los tanques después del intercambio (Bailey, et al., 2011).

Por su parte, la República Oriental del Uruguay, en el año 2006, a través de su autoridad marítima, la Prefectura Nacional Naval (PNN), estableció la Disposición Marítima N°109 "Directrices para el control y la gestión del agua de lastre de los buques", con objetivos similares a los esperados en el BWM 04 y en la reglamentación de su par rioplatense (Uruguay. Prefectura Nacional Naval, 2006).

Hacia fines de 2017, Argentina ratificó el Convenio BWM 04 y originó la ordenanza DPAM N° 07/2017 "Normas para el control y la gestión del agua de lastre y los sedimentos de los buques, artefactos navales u otras construcciones flotantes" (Argentina. Prefectura Naval Argentina, 2017), donde se exige que todos los barcos que ingresen en aguas jurisdiccionales del país deben realizar la correcta gestión de sus aguas de lastre. Al momento de arribar a puerto, los inspectores realizan controles documentales del Certificado Internacional de Agua de Lastre, el Plan de gestión y sedimentos, y el Libro Registro, donde se asienta la operatoria de gestión de las aguas de lastre. En el caso de que los buques hayan realizado el cambio de sus aguas de lastre en aguas oceánicas, se le realiza un control adicional, midiendo la salinidad. El mismo consiste en la toma de muestras de agua de tanques de lastre, utilizando equipos digitales específicos, y el control de su salinidad (ésta nunca debe exceder los 30 ppm). En caso de incumplimiento, la autoridad marítima local puede aplicar sanciones y prohibir cualquier operación hasta que se realice la descarga en tierra o el intercambio del agua de lastre correcto. Las sanciones se aplican de acuerdo con la gravedad en la violación de la ley y la amenaza potencial para el medio ambiente acuático (Abelando, et al., 2020).

Para cumplir con el BWM 04, los buques deben gestionar su agua de lastre de acuerdo con la norma de cambio de agua de lastre (Regla D-1) o a través de la norma de eficiencia (Regla D-2). Según el calendario para la implantación de la norma de eficiencia (D-2), se obliga a toda la flota de navegación internacional a poseer una planta de tratamiento a más tardar el 8 de septiembre de 2024, definido en la enmienda a la Regla B-3 del BWM 04 (Organización Marítima Internacional, 2018).

Los buques que efectúen el cambio de agua de lastre lo harán a por lo menos 200 millas marinas de la tierra más próxima y en aguas de 200 metros de profundidad como mínimo. De no ser posible, deberá efectuarse a por lo menos 50 millas marinas de la tierra y en aguas de 200 metros de profundidad como mínimo. Este procedimiento debe realizarse con una eficacia del 95% de cambio volumétrico del agua de lastre. Mientras que los buques que utilicen la Regla D-2, deberán tener a bordo un sistema de tratamiento del agua de lastre aprobado por OMI. Estos sistemas consisten en equipos que utilizan procedimientos mecánicos, físicos y/o químicos que permiten neutralizar o eliminar a los organismos acuáticos perjudiciales y agentes patógenos o reducir su volumen acorde a los niveles establecidos en el convenio. El equipo utilizado debe garantizar que, al llegar a puerto, el buque descargará agua de lastre previamente tratada y con un contenido de menos de 10 organismos viables por metro cúbico, cuyo tamaño mínimo sea igual o superior a 50 micras; y menos de 10 organismos viables por mililitro, cuyo tamaño mínimo sea inferior a 50 micras y superior a 10 micras. Asimismo, las

cantidades de microbios indicadores no deben exceder determinadas concentraciones: *Vibrio cholerae* toxicógeno (O1 y O139), menos de 1 unidad formadora de colonias (UFC) por 100 mililitros o menos de 1 UFC por gramo (peso húmedo) de muestras de zooplancton; *Escherichia coli*, menos de 250 UFC por 100 mililitros, y enterococos intestinales, menos de 100 UFC por 100 mililitros.

El objetivo del presente trabajo es realizar una revisión de las tareas de control en la gestión del agua de lastre en los puertos argentinos situados en la Cuenca del Plata, y verificar si los controles fueron efectivos para evitar el ingreso de nuevas especies invasoras.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En la Cuenca del Plata, las especies invasoras más estudiadas y emblemáticas son el mejillón dorado *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) y dos especies de almejas, *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) y *C. largillierti* (Philippi, 1844), que afectan económicamente a las industrias, y a las centrales termoeléctricas e hidroeléctricas. En el caso del mejillón dorado, se requieren operaciones de limpieza muy costosas de equipos utilizados en las centrales hidroeléctricas para mantenerlos libres de esta especie y asegurar su funcionamiento eficiente (Darrigran y Damborenea, 2005; Boltovskoy, et al., 2006). En consecuencia, y hasta no entrar en vigencia el BWM 04, los países afectados debieron tomar una serie de medidas individuales relacionadas con los problemas causados por la introducción de organismos invasores y agentes patógenos a través de los buques.

El trabajo preventivo, como el control en el cumplimiento del BWM 04 que realizan las autoridades marítimas, es fundamental para evitar el ingreso de especies invasoras en la Cuenca del Plata, como así también la investigación científica para poder lograr controles más eficientes, particularmente en la verificación del cumplimiento de la Regla D-2.

En este estudio se analizan datos publicados e inéditos acerca del cumplimiento de la normativa nacional e internacional, análisis de riesgo, tendencias y comparaciones con otros países limítrofes, con especial énfasis en el trabajo realizado en los últimos años por la autoridad marítima argentina.

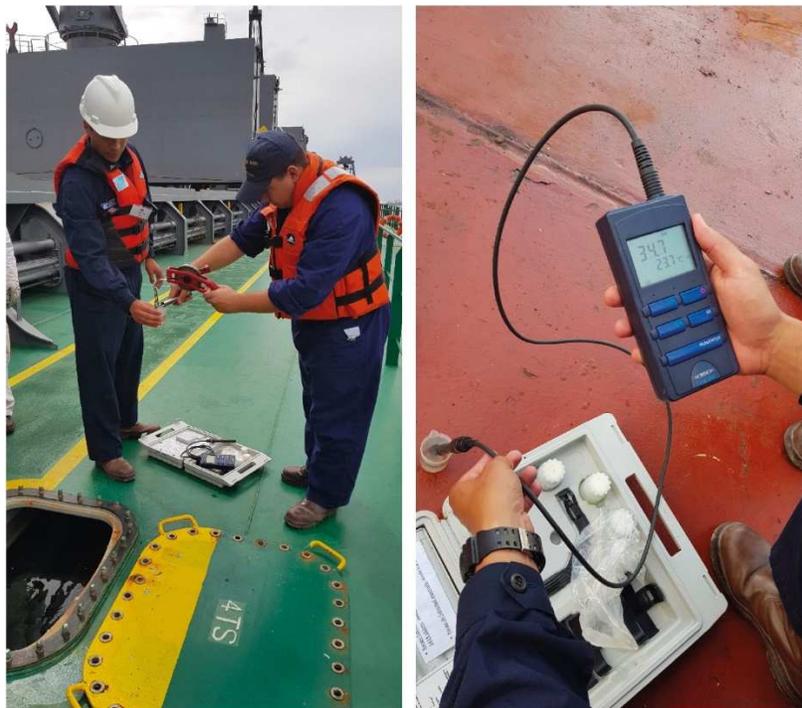
Desde el año 2011, la PNA realiza inspecciones exhaustivas a través de personal capacitado en los puertos fluviales para verificar el cumplimiento de las regulaciones nacionales. El procedimiento consta de varias etapas:

1. Previo arribo del buque: entre las 24 y 48 horas anteriores al arribo de un buque a puerto, la agencia marítima, como representante del mismo en el país, envía a la PNA la información necesaria para que evalúe si se le permitirá o no el deslastro

de sus aguas en el puerto. Los documentos enviados son el Certificado Internacional de Gestión de agua de lastre vigente y el último reporte de cambio o tratamiento de agua de lastre. En el caso de que el buque utilice el método de cambio de agua de lastre (Regla D-1), la información presentada en el reporte permite georreferenciar en el Sistema Guardacostas (software propio PNA) el sitio donde se realizó el cambio del agua y verificar si efectivamente se efectuó acorde a lo establecido en la normativa vigente.

2. Arribo del buque a puerto: personal capacitado de PNA aborda el buque para realizar la toma de muestras de agua de los tanques a deslastrar y verificar su salinidad (Figura 1). Para ello se utiliza un equipo salinómetro marca WTW 315. El agua contenida en los tanques debe tener una salinidad superior a 30 ppm. Valores menores indican que existe la posibilidad de que se trate de agua tomada a bordo en un ambiente costero, o que el reemplazo llevado a cabo en altamar fue insuficiente o inefectivo. Si la documentación y la medición de salinidad son correctos se le permite el deslastre en puerto.

3. Luego de la inspección, se transfieren los datos obtenidos a la planilla de Control de Gestión de Agua de Lastre y se envía la información obtenida a la Dirección de Protección Ambiental. Allí se realiza el análisis estadístico de los datos recabados en todos los puertos para generar mejoras en los controles y así reducir al mínimo el riesgo de introducción de organismos acuáticos no deseados.



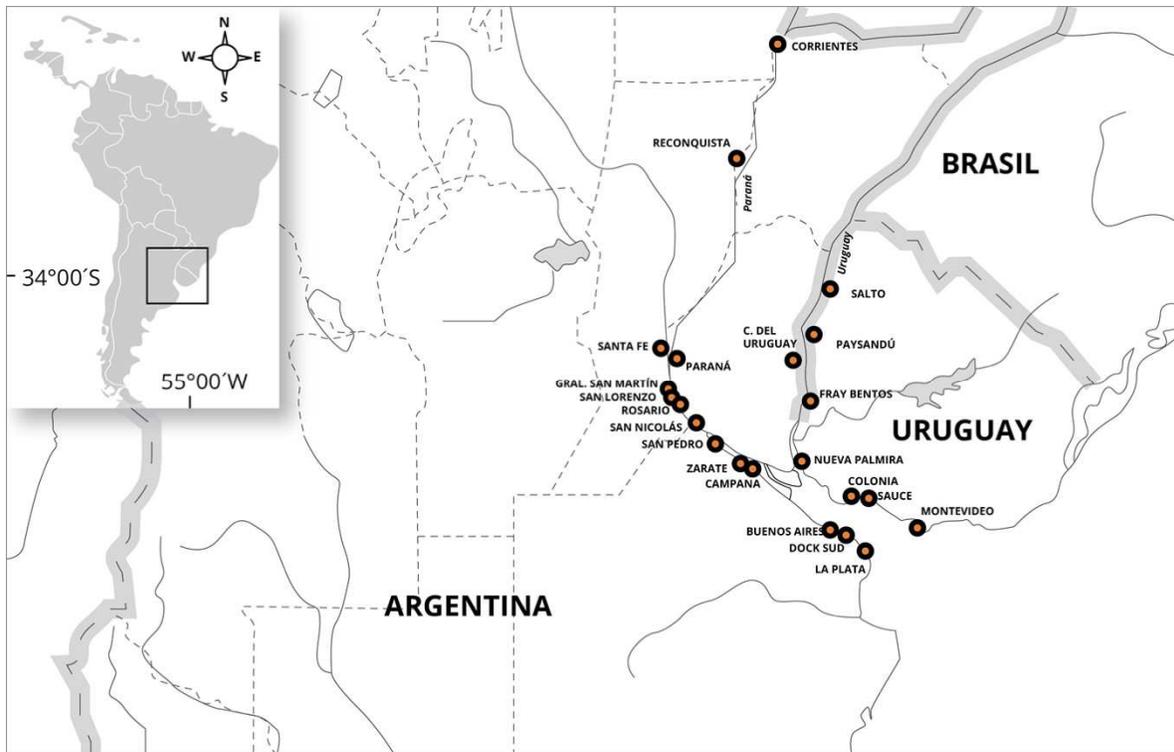
**Figura 1.** Personal de la PNA realizando medición de salinidad en un tanque de lastre en el puerto de Gral. San Martín–San Lorenzo, provincia de Santa Fe, Argentina.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Riesgo de invasión**

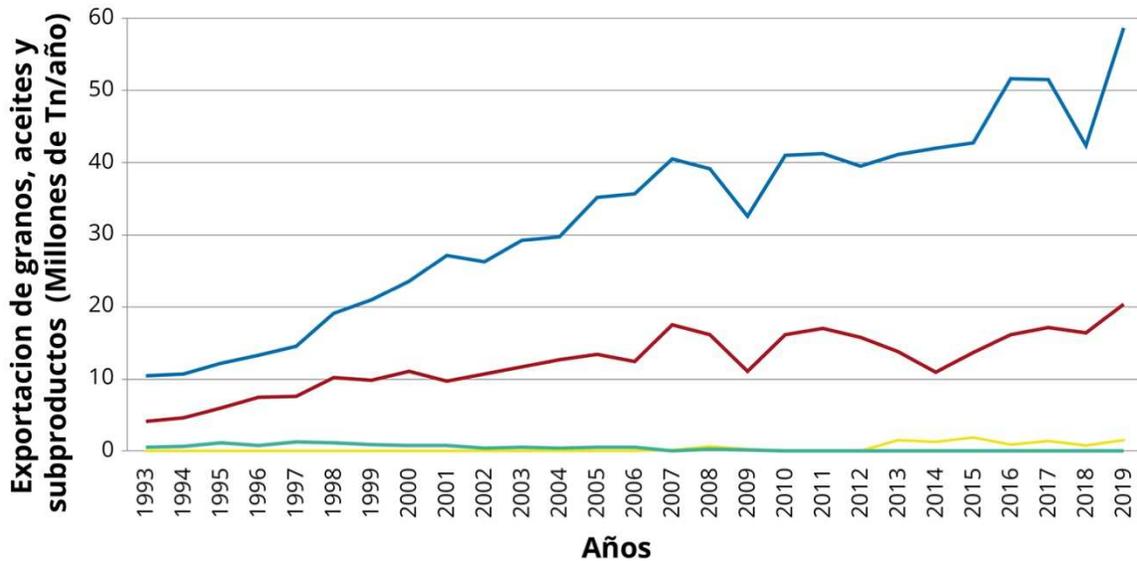
Varios autores señalan que la frecuencia e intensidad (o tamaño) de la inoculación son componentes críticos para los casos de riesgo de invasión (Ruiz, et al., 1997; Santagata, et al., 2008; National Research Council, 2011; Castro, et al., 2018). Los puertos colonizados se convierten posteriormente en fuentes de especies invasoras para las áreas vecinas, transportadas por buques que realizan transporte nacional y embarcaciones de recreo, a través del agua de lastre o por bioincrustaciones (Rup, et al., 2010). Además, cuanto mayor sea la similitud ambiental entre el puerto donador y el receptor, mayor será la probabilidad de éxito de la invasión biológica (Carlton, 1985).

La conexión de los principales puertos y terminales fluviales de la Cuenca del Plata con el océano es la vía fluvial más importante de la República Argentina, y resulta vital para el comercio exterior del país (Argentina. Ministerio de Planificación Federal, Inversión Pública y Servicios, 2008). La mayoría de los puertos argentinos se encuentran ubicados sobre el Río Paraná y el Río de la Plata, desde la ciudad de San Lorenzo, en Santa Fe, hasta Ensenada, en Buenos Aires (Figura 2).



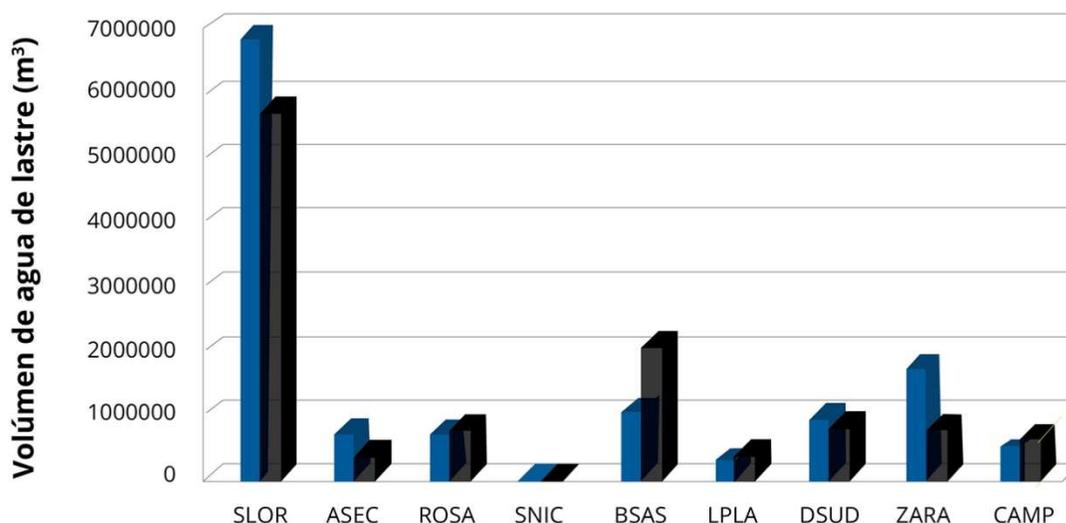
**Figura 2.** Puertos argentinos y uruguayos más importantes ubicados en la parte inferior de la Cuenca del Plata.

El Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca realiza el seguimiento de las exportaciones de granos, aceite y subproductos que se exportan en la República Argentina. En la Figura 3 se observa que los puertos con mayor tasa de exportación en la Cuenca del Plata son Gral. San Martín-San Lorenzo y Rosario, ubicados ambos a orillas del Río Paraná. En el año 2019, las exportaciones en el país estuvieron representadas en un 62.4% por la venta de cereales y en un 14% por las semillas y frutos oleaginosos. Mientras que el resto de las exportaciones se vieron representadas por pescados y mariscos (9%), frutas frescas (5%), hortalizas y legumbres sin elaborar (3.3%), tabaco sin elaborar y miel, entre otros (Argentina. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, 2020). Estos valores no solo demuestran la importancia de las exportaciones de granos para nuestro país, sino también la intensidad de la inoculación ya que la contrapartida al peso de esa carga se encuentra representada por toneladas de agua de lastre contenida en los buques que llegan a los puertos de la Cuenca del Plata desde diferentes puertos del mundo.



**Figura 3.** Exportaciones de granos, aceite y subproductos (millones de Tn/año) en los puertos más importantes ubicados sobre el Río Paraná: Gral. San Martín-San Lorenzo (azul), Rosario (rojo), Zarate (amarillo) y el Río de la Plata: Buenos Aires (verde), desde el año 1993 al 2019 (Argentina. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, 2020).

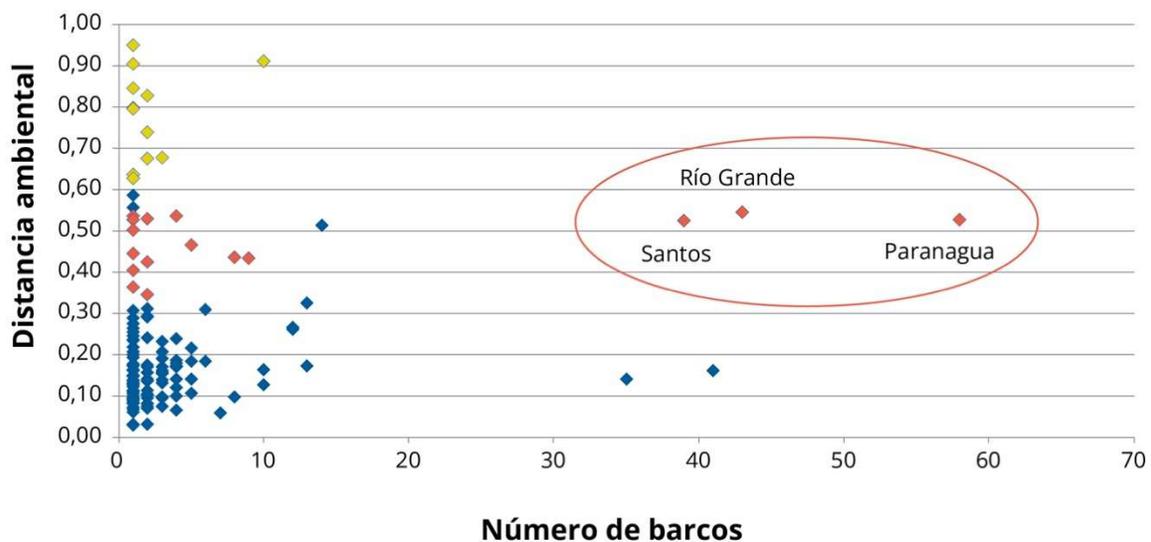
Al analizar las inspecciones realizadas desde la entrada en vigencia del BWM 04 (2018-2019) en los principales puertos del país (datos PNA, Figura 4), se observa que los volúmenes se mantienen constantes, especialmente en el puerto de Gral. San Martín-San Lorenzo: al ser el mayor agroexportador de granos y aceites, es uno de los que recibe mayor cantidad de agua de lastre. Los puertos de Zarate, Buenos Aires y La Plata reciben menos cantidad de agua de lastre porque, en general, los buques que allí arriban son de tipo portacontenedores, Ro-Ro o cruceros, los cuales llegan al puerto con carga y vuelven a zarpar con carga, realizando poco movimiento de agua en sus tanques de lastre.



**Figura 4.** Volumen de agua de lastre descargado en los principales puertos del país durante los años 2018 (azul) y 2019 (negro). Los valores corresponden solo a los volúmenes de inspecciones efectuadas en los años citados. Ref.: SLOR: San Lorenzo, ASEC: Arroyo Seco, ROSA: Rosario, SNIC: San Nicolás, BSAS: Buenos Aires, LPLA: La Plata, DSUD: Dock Sud, ZARA: Zarate, CAMP: Campana.

Abelando y otros (2020) estudiaron las inspecciones realizadas sobre la gestión del agua de lastre a bordo de los buques que arribaron al puerto de Gral. San Martín-San Lorenzo (SLOR), en el año 2017, con el objetivo de evaluar el riesgo de invasiones biológicas en dicho puerto. Ese es el primer estudio exhaustivo realizado en la Cuenca del Plata que combinó el tráfico general de buques, datos ambientales de los puertos globales y las acciones de control realizadas. Las autoras calcularon un Coeficiente de Riesgo Global (CRG), considerando: frecuencia relativa de la cantidad de tanques de lastre de un puerto específico en relación con la cantidad total de tanques descargados (frecuencia de los inóculos); proporción del volumen de agua de lastre de un puerto específico en relación con el volumen total descargado en SLOR (tamaño de los inóculos) y un análisis multivariado, con un coeficiente de distancia euclidiana, de donde se obtuvieron valores de similitud ambiental entre el puerto de recepción de agua de lastre y el último puerto. Obtuvieron que solo el 5% de los barcos arribados provenían de un puerto fluvial, principalmente de Brasil (Porto Alegre y Santa Clara) y China (Tianjiazhen, Zhongshan, Ma'anshan y Machong).

Por otra parte, los buques provenientes de puertos con características estuariales, principalmente de Brasil, Singapur y Durban, constituyeron el 37% del total de las visitas al puerto de SLOR (Figura 5). Ruiz y otros (1997) consideran que los estuarios son los lugares más invadidos, ya que las especies que habitan allí incluyen una amplia gama taxonómica de diversos grupos tróficos (por ejemplo, filtradores, raspadores, colectores, parásitos) y ocupan diferentes hábitats (por ejemplo, sedimentos blandos, sustratos duros, superficie de pantanos y columna de agua). Si bien desde el punto de vista ambiental los puertos de tipo estuarial muestran una menor similitud con los fluviales, pueden implicar un mayor riesgo de invasión debido a la frecuencia de entrada de barcos con agua de ese origen, y más aún si contienen especies con amplia tolerancia ambiental.



**Figura 5.** Tráfico de buques y distancia ambiental (calculada en base a la salinidad y temperatura de cada puerto fuente y el Puerto de San Lorenzo). Azul: puertos marinos, rojo: puertos estuariales y amarillo: puertos fluviales. Los puertos marcados con un óvalo son los que aportan la mayor cantidad de agua de lastre. Fuente: (Abelando, et al., 2020).

Al momento del control, los procedimientos de muestreo de agua de lastre pueden ser uniformes o selectivos para los buques que arriban a un determinado puerto. En los muestreos uniformes, todos los barcos son sometidos a los mismos procedimientos estandarizados, lo que los hace costosos y técnicamente poco prácticos (Ta-Kang, et al., 2014). Para evaluar el riesgo de invasiones en los puertos, Abelando y otros (2020) proponen conocer cuáles son los últimos puertos de parada

y las rutas marítimas de las embarcaciones que arriban a cada puerto del país. Con un control selectivo de las embarcaciones, considerando el origen del agua de lastre y la frecuencia de arribo a cada puerto, las autoridades marítimas podrían optimizar sus recursos humanos y económicos. Un análisis de riesgo similar podría aplicarse en el control Norma D-2, incluyendo algún coeficiente específico.

## **Efectividad en los controles**

### *A) Cambio del agua de lastre (Regla D-1)*

En cuanto al control en el cumplimiento de las ordenanzas nacionales en los últimos años y la normativa internacional (BWM 04), se observó que el grado de cumplimiento por parte de la flota internacional ha mejorado sustancialmente en algunos países de Sudamérica (Castro, et al., 2017, Abelando, et al., 2020).

En Argentina existían dos antecedentes dirigidos a estudiar el movimiento portuario asociado con el agua del lastre de buques, uno principalmente en puertos marítimos de la Patagonia (Boltovskoy, et al., 2011) y otro en el puerto de Buenos Aires (Ávila Velandia, 2016). En el primer estudio, realizado en el puerto fluvial de Dock Sud (Buenos Aires, Argentina) y en cuatro puertos marítimos durante el periodo 2007 y 2008, se observó que en la mayoría de los buques las tripulaciones estaban familiarizadas con las regulaciones de la OMI. Sin embargo, en más del 70% de los buques inspeccionados, las regulaciones argentinas eran desconocidas y en el 60% era imposible establecer la fuente del agua de lastre. Ávila Velandia (2016) obtuvo resultados similares entre 2010 y 2011 para el puerto de Buenos Aires, donde más de la mitad de las inspecciones contenían errores, omisiones o inconsistencias en las planillas presentadas.

A diferencia de las observaciones hechas por estos investigadores, previas a la entrada en vigencia del BWM 04; Abelando y otros (2020) observaron que la documentación presentada por los buques en el puerto de San Lorenzo era correcta, así como también la gestión del agua de lastre a bordo. Esta mejora sustancial en el cumplimiento podría deberse, en parte, a la entrada en vigencia del citado convenio; y también a que, durante la última década, la Prefectura Naval Argentina aumentó la cantidad de inspecciones a bordo e incorporó una serie de cursos de capacitación para su personal, lo que permitió mayor control y eficiencia en las mismas.

En otros países de la región como Brasil, Pereira y otros (2018) realizaron un estudio entre los años 2012 y 2013 en el Puerto de Santana, ubicado en la región amazónica, donde observaron que la efectividad del cambio del agua de lastre mostró deficiencias considerables, como por ejemplo fallas en la información sobre el origen y los volúmenes de intercambio de agua de lastre. Castro y otros (2017)

realizaron un trabajo similar en diferentes puertos de Brasil, entre los años 2005 y 2015, y luego de 10 años de esfuerzo en los controles de la autoridad marítima, se evidenciaron altos niveles de cumplimiento con las regulaciones de gestión del agua de lastre. Sin embargo, también mostraron discrepancias en el régimen de inspección entre puertos a lo largo de la costa. Los autores consideraron que esta disminución en el incumplimiento probablemente refleja un aumento en el conocimiento de la norma brasilera y un mayor compromiso de la industria naviera para minimizar la propagación de especies invasoras.

Las regulaciones nacionales que exigen el intercambio de agua de lastre en medio del océano, utilizando el cambio osmótico para eliminar a las especies costeras, se ha implementado en muchos lugares del mundo desde principios de la década de 1990. Si bien existe evidencia de que el intercambio de agua de lastre ha reducido efectivamente las introducciones en los Grandes Lagos (Canadá y Estados Unidos), donde se observó un alto nivel de aplicación, aún persiste una gran incertidumbre sobre el grado de protección que este método ofrece a las zonas marinas costeras (Bailey, et al., 2020).

En la Cuenca del Plata, donde se encuentran los puertos comerciales de mayor actividad (Buenos Aires, La Plata y Montevideo), además de *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), registrada por primera vez en 1991 (Pastorino, et al., 1993), y las almejas *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) y *C. largillierti* (Philippi, 1844) durante 1970 (Ituarte, 1981), se han establecido otras especies. Entre ellas, el gasterópodo *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) en 1998 (Scarabino, et al., 1999 y Pastorino, et al., 2000), la medusa *Blackfordia virginica* (Mayer, 1910) en el año 2000 (Genzano, et al., 2006) y *Manayunkia speciosa* (Leidy, 1858) registrada en 2007, presente solo en el Río Uruguay (Armendariz, et al., 2011). La mayoría de estas especies fueron citadas por primera vez entre los años 1979 y 2007, siendo los buques el vector primario de ingreso (agua de lastre y/o bioincrustaciones), no reportándose nuevas especies invasoras en la última década.

Una situación diferente fue la observada por Schwindt y otros (2020), en el sudoeste del Océano Atlántico, al realizar una revisión de las especies invasoras, tomando como base el trabajo de Orensanz y otros (2002), primer estudio completo de organismos marinos exóticos, donde databa la presencia de 31 especies introducidas y 46 criptogénicas. Esta nueva revisión completa ha demostrado que durante las últimas dos décadas el número de introducciones supera las 120 especies, cuatro veces el número informado anteriormente.

Del análisis de la efectividad de los controles hasta el presente, el cual se ha hecho principalmente a través de la verificación de la Regla D-1 en la Cuenca del Plata, se podría inferir que estos han sido efectivos para evitar el ingreso de nuevas especies invasoras en el transcurso de la última década; contrariamente a lo ocurrido en el

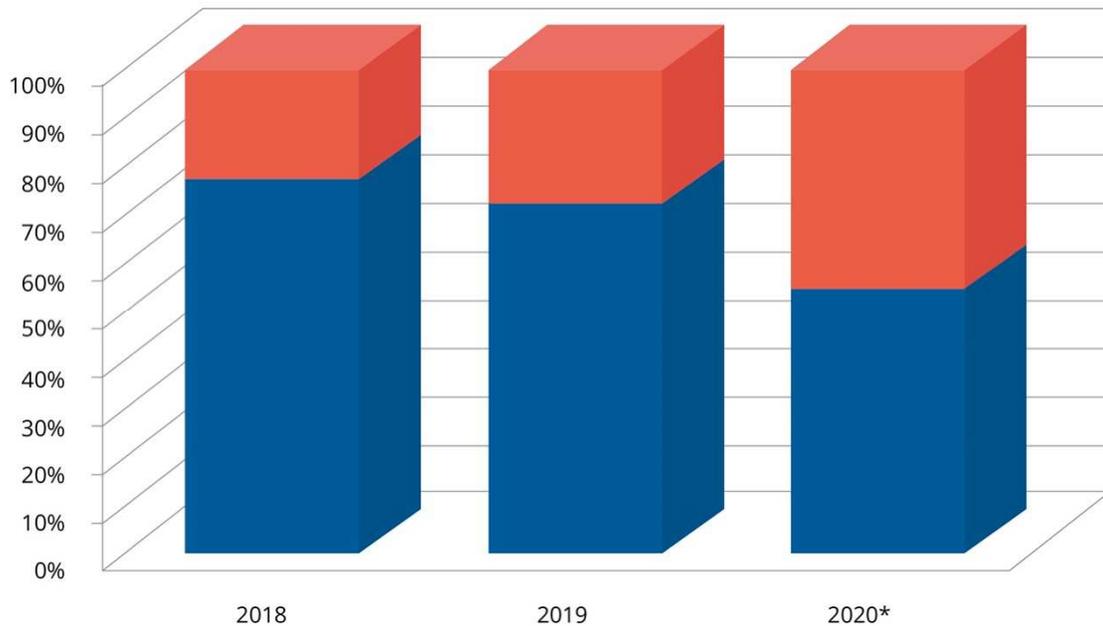
Mar Argentino, donde la medición de salinidad no es útil para discernir el origen del agua de lastre. Se necesitan más investigaciones para verificar si existe algún tipo de relación entre la aparición de nuevas especies, el cumplimiento de la normativa vigente y la frecuencia e intensidad del tráfico marítimo.

*B) Eficiencia para el tratamiento del agua de lastre (Regla D-2)*

Con la entrada en vigencia del BWM 04, los buques tienen un plazo determinado para instalar a bordo sistemas de tratamiento de agua de lastre y dejar de utilizar el cambio de agua de lastre como medida de gestión. Acorde a la última enmienda realizada al BWM 04 (Organización Marítima Internacional, 2018), referente al calendario para la implantación de la norma de eficiencia (Regla D-2), los buques deben instalar una planta de tratamiento según la fecha de renovación del certificado internacional de prevención de la contaminación por hidrocarburos, conocido como Convenio MARPOL (Organización Marítima Internacional, 1973).

Esta norma de eficacia es el resultado de prolongadas negociaciones entre los Estados Miembros de la OMI, y representa un compromiso cuya finalidad es promover el desarrollo de opciones más seguras y eficaces de gestión del agua de lastre. El desarrollo y la aprobación de los sistemas de tratamiento requiere de una serie de pruebas de desempeño teniendo en cuenta diferentes variables como: tipos de buques existentes, rutas de navegación, condiciones climáticas, posición geográfica, uso o no de sustancias activas y legislación local e internacional (Organización Marítima Internacional, 2004).

En la actualidad, existen en el mercado numerosos equipos de tratamiento aprobados por la OMI e instalados a bordo de las embarcaciones. Del análisis de las inspecciones efectuadas desde la entrada en vigencia del convenio en puertos argentinos, se observó un incremento en la cantidad de buques que poseen estos sistemas (Figura 6). Esto es un buen indicio del compromiso de los países para cumplir con lo establecido en el convenio y contribuir a la preservación de la biodiversidad mundial.



**Figura 6.** Porcentaje de métodos de gestión del agua de lastre registrado en las inspecciones realizadas en puertos argentinos de la Cuenca del Plata durante los años 2018, 2019 y 2020\* (de enero a mayo). Ref.: azul: D-1 y rojo: D-2.

El tratamiento del agua de lastre antes de ser vertida en un puerto provee una mejora sustancial ya que disminuiría la cantidad de potenciales especies invasoras. Sin embargo, hay algunas cuestiones aun no resueltas al respecto, las cuales se encuentran en etapa de estudio y reglamentación.

Una de ellas se basa en una cuestión práctica al momento de realizar una inspección. Como ya se mencionó más arriba, la norma de eficacia se basa en el número de microorganismos y patógenos presentes en el agua de lastre. Esto hace que la verificación del cumplimiento o incumplimiento de esta norma presente algunos inconvenientes como: a) la obtención de una muestra representativa, ya que no todos los tanques tienen el mismo volumen, y los microorganismos presentes poseen tamaño y comportamiento diferentes dentro del tanque; b) el análisis de la presencia de los organismos planctónicos requiere microscopios y personal capacitado en cada puerto, y en el caso de patógenos la infraestructura adecuada para su análisis; c) los métodos de medición de salinidad utilizados para comprobar la Regla D-1 ya no son válidos y d) no generar demoras innecesarias en el buque, siendo que algunos de los análisis requieren un plazo de 24 o 48 horas para la obtención del resultado.

A pesar de los esfuerzos de los países miembros del Comité de Protección del Medio Ambiente de OMI (MEPC, por sus siglas en inglés), quienes han generado una serie de directrices como las "Orientaciones sobre el muestreo y análisis del agua de lastre" (Organización Marítima Internacional, 2015) y las permanentes enmiendas a fin de perfeccionar las directrices para facilitar las tareas y mejorar sus resultados, aun no se ha logrado el consenso en cuanto a un único método para comprobar la efectividad de la Regla D-2.

Otro punto a considerar guarda relación con que no todos los sistemas de tratamiento garantizan el 100% de eficiencia, es decir, ninguno de ellos es capaz de erradicar por completo especies exóticas o patógenas del agua de lastre. Varios estudios han señalado problemas con la eficiencia de estos sistemas (Mesbahi, 2004; Cohen y Dobbs, 2015; Paolucci, et al., 2015; Lin, et al., 2020), así como también se han observado problemas de operación con los equipos tales como taponamiento de filtros, falta de biocidas en los puertos para su adquisición, excesiva turbidez, toxicidad, corrosión y falta de compromiso de la tripulación en la operación de los equipos, entre otros (Bakalar, 2016; Pereira y Brinati, 2018).

En la actualidad, la mayoría de los países de Sudamérica no cuentan con la capacidad operativa o técnica de controlar todos los buques que entran a sus puertos o aguas territoriales con sistemas de tratamiento a bordo, por los motivos detallados anteriormente. El problema aún no está totalmente resuelto para la comunidad marítima internacional, y además presenta un gran desafío futuro para los países al momento de realizar los controles en los puertos.

## CONCLUSIONES

La Cuenca del Plata es un gran receptor de agua de lastre proveniente de diferentes puertos del mundo. Por ello, toda medida tendiente a evitar consecuencias negativas en el ambiente, la salud y la economía de una región es necesaria, siendo la prevención reconocida globalmente como la opción más efectiva y deseable para evitar la introducción de nuevas especies y su dispersión en el medio acuático.

Luego de una década de trabajo, en la República Argentina fueron varios los factores que contribuyeron para minimizar el ingreso de especies exóticas invasoras en la Cuenca del Plata, donde desde el año 2011 no se reportaron nuevas invasiones, a diferencia de lo ocurrido en el Mar Argentino. Entre ellos, la efectividad en el control del cumplimiento de las reglamentaciones nacionales e internacionales, el mayor grado de compromiso de la flota mercante y el aumento de la capacidad técnica del personal de la PNA.

Asimismo, se debe continuar con los esfuerzos y aumentar las investigaciones sobre especies exóticas invasoras en los puertos, como la construcción de una línea de base portuaria y monitoreos frecuentes, la capacitación continua del personal perteneciente a la autoridad marítima, mantener contacto fluido con diferentes actores del ambiente marítimo y portuario, así como también lograr mayor eficiencia en los controles portuarios a través de la optimización de los recursos. En un futuro cercano, también sería importante comenzar a incorporar información relativa a la fuente de origen (análisis de riesgo), a los formularios de agua de lastre y al diseño de sistemas de alerta temprana en los puertos. Todas estas acciones beneficiarán a los países de la región, particularmente en el control del cumplimiento de la Regla D-2, donde las dificultades técnicas y operativas no permiten el control de la totalidad de buques arribados a puertos.

La gestión de las invasiones debe abordarse desde un punto de vista holístico. La cooperación regional es de crucial importancia, en especial en regiones geográficas donde los ecosistemas sobrepasan las fronteras políticas, como lo es la Cuenca del Plata, conformada por cuatro países (Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay). La participación de las autoridades nacionales, tanto marítimas como ambientales, da como resultado asociaciones que facilitan el entendimiento y los enfoques comunes, al igual que el intercambio de información, experiencias, conocimientos científicos y compromisos. Sobre todo, cuando dos de los países (Argentina y Brasil) ya han ratificado el Convenio de agua de lastre y han logrado una experiencia interesante en su implantación.

Otro de los desafíos a futuro es el control de bioincrustaciones en los cascos y zonas "nicho" de los buques (ranuras y oquedades, cajones de toma de mar, mecha y bisagra del timón, guardacabos, juntas de la bocina y ejes portahélices, cadena del ancla, entre otros). Al igual que ocurre con el agua de lastre, los grandes puertos actuarían como regiones receptoras primarias de las especies invasoras que llegan desde una región distante. Una vez establecidas allí, procesos naturales (natación activa, transporte pasivo de larvas o deriva) y mecanismos de dispersión mediados por el hombre (embarcaciones de recreo, acuicultura, pesca y restauración) pueden facilitar su propagación secundaria hacia otras localidades cercanas, logrando así una mayor expansión en su rango de distribución (Occhipinti-Ambrogi, 2007; Floerl, et al., 2005; Ferrario, et al., 2017, Bailey, et al., 2020).

Dada la importancia de esta problemática, la OMI, en su resolución MEPC.207(62) "Directrices de 2011 para el control y la gestión de la contaminación biológica de los buques a los efectos de reducir al mínimo la transferencia de especies acuáticas invasivas" (Organización Marítima Internacional, 2011), recomienda la remoción de bioincrustaciones durante inspecciones periódicas, pero resalta la necesidad -antes de proceder- de evaluar el riesgo para el medio ambiente y los recursos, ya sea por

la liberación de organismos como por la liberación de tóxicos procedentes de los residuos de las pinturas antiincrustantes.

Por todo lo expuesto, los Programas de Detección Temprana a nivel nacional y regional serán la clave para evitar la expansión de las especies invasoras con un mínimo costo económico y permitirán generar una base de datos de las especies presentes en los puertos para poder detectar las regiones más sensibles, y así escoger las medidas de manejo más adecuadas. Estos programas son útiles tanto para el control del agua de lastre como para el estudio de las bioincrustaciones en los buques.

## AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a la jefatura de la Dirección de Protección Ambiental de la Prefectura Naval Argentina por brindar apoyo para la investigación sobre las invasiones biológicas. A la Dra. Jessica Chiarandini Fiore, la Lic. Magalí Bobinac y la Lic. Laura Abelando por sus sugerencias y comentarios críticos para mejorar este trabajo.

## REFERENCIAS

Abelando, M., Bobinac, M. y Chiarandini Fiore, J., 2020. Assessment of the efficiency of controls to prevent biologic invasions at the San Lorenzo Port, Argentina.

En: *Environmental Monitoring and Assessment*, 192, pp.420. DOI:

<https://doi.org/10.1007/s10661-020-08359-2>

Argentina. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, 2020. *Exportaciones* [En línea]. Buenos Aires: MAGYP. [Consulta: 18 de agosto de 2020]. Disponible en:

[https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/ss\\_mercados\\_agropecuarios/exportaciones/](https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/ss_mercados_agropecuarios/exportaciones/)

Argentina. Ministerio de Planificación Federal, Inversión Pública y Servicios, 2008. *Plan maestro y director del Sistema de Navegación Troncal. Visión estratégica y bases para su formulación en el Río Paraná* [En línea]. Buenos Aires:

Subsecretaría de Puertos y Vías Navegables, Secretaría de Transporte, Ministerio de Planificación Federal. [Consulta: 18 de agosto de 2020]. Disponible en:

<https://www.estudioayd.com.ar/data/PresentacionPLANyLIBRO.pdf>

- Argentina. Prefectura Naval Argentina, 1998. Ordenanza DPAM No 7/98. Prevención de la contaminación con organismos acuáticos en el lastre de barcos destinados a puertos argentinos en la Cuenca del Plata. Buenos Aires: PNA. (Derogada).
- Argentina. Prefectura Naval Argentina, 2017. *Ordenanza DPAM No. 07/17. Normas para el control y la gestión del agua de lastre y los sedimentos de los buques, artefactos navales u otras construcciones flotantes* [En línea]. Buenos Aires: PNA. [Consulta: 19 de octubre de 2021]. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/prefectura naval/reglamentacion/ordenanzas>
- Armendariz, L., Paola, A. y Rodrigues Capítulo, A. 2011. *Manayunkia speciosa* Leidy (Polychaeta: Sabellidae): introduction of this nonindigenous species in the Neotropical Region (Uruguay river, South America). En: *Biological Invasions*, 13, pp.281–284. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10530-010-9838-0>
- Ávila Velandia, M.F., 2016. *Evaluación del riesgo de introducción de especies invasoras en agua de lastre en buques que operan en el puerto de Buenos Aires*. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires. (Tesis de Maestría).
- Bailey, S., Deneau, M., Jean, L., Wiley, C., Leung, B. y MacIsaac H., 2011. Evaluating efficacy of an environmental policy to prevent biological invasions. En: *Environmental Science and Technology*, 45(7), pp.2554-2561. DOI: <https://doi.org/10.1021/es102655j>
- Bailey, S., Brown, L., Campbell, M., Canning-Clode, J., Carlton, J., Castro, N., Chainho, P., Chan, F., Creed, J., Curd, A. y Darling, J., 2020. Trends in the detection of aquatic non-indigenous species across global marine, estuarine and freshwater ecosystems: A 50-year perspective. En: *Biodiversity research*, 26(12), pp1780-1797. DOI: <https://doi.org/10.1111/ddi.13167>
- Bakalar, G., 2016. Comparisons of interdisciplinary ballast water treatment systems and operational experiences from ships. En: *SpringerPlus*, 5, 240. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1916-z>
- Boltovskoy, D., Correa, N., Cataldo, D. y Sylvester, F., 2006. Dispersion and ecological impact of the invasive freshwater bivalve *Limnoperna fortunei* in the Río de la Plata watershed and beyond. En: *Biological Invasions*, 8(4), pp.947-963. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1916-z>

- Boltovskoy, D., Almada, P. y Correa, N., 2011. Biological invasions: assessment of threat from ballast-water discharge in Patagonian (Argentina) ports. En: *Environmental Science & Policy*, 14(5), pp.578-583. DOI: [https://10.1016/j.envsci.2011.03.007](https://doi.org/10.1016/j.envsci.2011.03.007)
- Carlton, J.T., 1985. Transoceanics and interoceanics dispersal of coastal marine organisms: the biology of ballast water. En: *Oceanography and Marine Biology*, 23, pp.313-374.
- Carlton, J.T., 1996. Pattern, process, and prediction in marine invasion ecology. En: *Biology Conservation*, 78, pp.97-106. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(96\)00020-1](https://doi.org/10.1016/0006-3207(96)00020-1)
- Castro, M., Hall-Spencer, J., Fonseca Poggian, C. y Filemand, T., 2017. Ten years of Brazilian ballast water management. En: *Journal of Sea Research*, 133, pp.36-42. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.seares.2017.02.003>
- Castro, M., Vance, T., Yunnice, A., Fileman, W. y Hall-Spencer, J., 2018. Low salinity as a biosecurity tool for minimizing biofouling on ship sea chests. En: *Ocean Science Discussions*, 14, pp.661-667. DOI: <https://doi.org/10.5194/os-2018-35>
- Cohen, A. y Dobbs, F., 2015. Failure of the public health testing program for ballast water treatment systems. En: *Marine Pollution Bulletin*, 9, pp.29-34. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.12.031>
- Darrigran, G. y Damborenea, C., 2005. A South American bioinvasion case history: *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), the golden mussel. En: *American Malacological. Bulletin*, 20, pp.105-112.
- Floerl, O., Inglis, G.J. y Hayden, B.J., 2005. A risk-based predictive tool to prevent accidental introductions of nonindigenous marine species. En: *Environmental Management*, 35(6), pp.765-778. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00267-004-0193-8>
- Ferrario, J., Caronni, S., Occhipinti-Ambrogi, A. y Marchini, A., 2017. Role of commercial harbours and recreational marinas in the spread of non-indigenous fouling species. En: *Biofouling*, 33(8), pp.651-660. DOI: <https://doi.org/10.1080/08927014.2017.1351958>

- GEF, PNUD e IMO, 2007. *Building Partnerships to assist developing countries to reduce the transfer of harmful aquatic organisms in ship's ballast water*. [En línea]. Londres: Globallast Partnerships [Consulta: 19 de octubre de 2021]. Disponible en: <http://archive.iwlearn.net/globallast.imo.org/>
- Genzano, G., Mianzan, H., Acha, E.M. y Gaitan, E., 2006. First record of the invasive medusa *Blackfordia virginica* (Hydrozoa: Leptomedusae) in the Río de La Plata, Argentina-Uruguay. En: *Revista Chilena de Historia Natural*, 79, pp.257-261.
- Gollasch, S., Matej, D., Voigt, M., Dragsund, E., Hewitt, C. y Fukuyo, Y., 2007. Critical review of the IMO International Convention of the management of ships ballast water and sediments. En: *Harmful algae*, 6, pp.585-600. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2006.12.009>
- Ituarte, C.F., 1981. Primera noticia acerca de la introducción de pelecípodos asiáticos en el área rioplatense (Mollusca Corbiculidae). En: *Neotrópica*, 27, pp.79-82.
- Lin, Y., Zhan, A., Hernandez, M., Paolucci, E., MacIsaac, H. y Briski, E., 2020. Can chlorination of ballast water reduce biological invasions? En: *Journal of Applied Ecology*, 57, pp.331–343. DOI: <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13528>
- Mesbahi, E., 2004. Latest results from testing seven different technologies under the EU MARTOB project- Where do we stand now? En: Matheickal, J., Raaymakers, S., eds. *Second International Symposium on Ballast Water Treatment*. Londres: IMO, pp.210-230.
- National Research Council, 2011. Assessing the relationship between propagule pressure and invasion risk in ballast water. Washington, DC: The National Academies Press. DOI: <https://doi.org/10.17226/13184>.
- Occhipinti-Ambrogi, A., 2007. Global change and marine communities: alien species and climate change. En: *Marine Pollution Bulletin*, 55(7), pp.342–352. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.11.014>
- Organización Marítima Internacional, 1973. MARPOL. *Convenio internacional para prevenir la contaminación por los buques, modificado por el Protocolo de 1978 y por el Protocolo de 1997 MARPOL* [En línea]. Londres: OMI. [Consulta: 19 de octubre de 2021]. Disponible en: [https://www.imo.org/es/About/Conventions/Pages/International-Convention-for-the-Prevention-of-Pollution-from-Ships-\(MARPOL\).aspx](https://www.imo.org/es/About/Conventions/Pages/International-Convention-for-the-Prevention-of-Pollution-from-Ships-(MARPOL).aspx).

- Organización Marítima Internacional, 1997. Resolución A.868(20). Directrices para el control y la gestión del agua de lastre de los buques a fin de reducir al mínimo la transferencia de organismos acuáticos perjudiciales y agentes patógenos. Londres: OMI.
- Organización Marítima Internacional, 2004. *International convention for the control and management of ship's ballast water and sediments*. Londres: OMI. ISBN 978-92-801-033-4
- Organización Marítima Internacional, 2011. *MEPC.207(62) Add1. Guidelines for the control and management of ships' biofouling to minimize the transfer of invasive aquatic species*. Londres: OMI.
- Organización Marítima Internacional, 2015. *BWM.2/Circ.42/Rev.1. Guidance on ballast water sampling and analysis for trial use in accordance with the BWM Convention and Guidelines (G2)*. Londres: OMI
- Organización Marítima Internacional, 2018. *MEPC.297(72) Enmiendas al Convenio internacional para el control y la gestión del agua de lastre y los sedimentos de los buques, 2004. Enmiendas a la regla B-3. Calendario para la implantación de la gestión del agua de lastre de los buques*. Londres: OMI
- Orensanz, J.M., Schwindt, E., Pastorino, G., Bortolus, A., Casas, G., Darrigran, G., Elías, R., López Gappa, J.J., Obenat, S., Pascual, M., Penchaszadeh, P., Piriz, M.L., Scarabino, F., Spivak, E.D. y Vallarino, E.A., 2002. No longer a pristine confine of the world ocean—a survey of exotic marine species in the Southwestern Atlantic. En: *Biological Invasions*, 4, pp.115–143. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1020596916153>
- Paolucci, E., Hernandez, M., Potapov, A., Lewis, M. y MacIsaac, H., 2015. Hybrid system increases efficiency of ballast water treatment. En: *Journal of Applied Ecology*, 52(2), pp. 348–357. DOI: <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12397>
- Pastorino, G., Darrigran, G., Martin, S. y Lunaschi, L., 1993. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mytilidae), nuevo bivalvo invasor en aguas del Río de la Plata. En: *Neotrópica*, 39, pp.101-102.
- Pastorino, G., Penchaszadeh, P.E., Schejter, L. y Bremec, C., 2000. *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) (Mollusca: Muricidae). A new gastropod in South Atlantic waters. En: *Journal of Shellfish Research*, 19, pp.897–899.

- Pereira, J., Pereira, N. y da Cunha, A., 2018. Monitoramento da qualidade da água de lastro como suporte à gestão no Porto de Santana-AP – Amazônia Estuarina/Brasil. Cap. 8. En: Pereira, Newton Narciso, ed. *Água de lastro: gestão e controle*. São Paulo: Blucher. pp.171-197.
- Pereira, N. y Brinati, H. 2018. Alternativas de tratamentos para água de lastro a bordo dos navios. Cap. 3. En: Pereira, Newton Narciso, ed. *Água de lastro: gestão e controle*. São Paulo: Blucher. pp.43-88.
- Pimentel, D., Rodolfo, Z. y Morrison, D., 2005. Update on the environmental and economic costs associated with alien invasive species in the United States. En: *Ecological Economics*, 52(3), pp.273–288.
- Ruiz, G., Carlton, J., Grosholz, E. y Hines, A., 1997. Global invasions of marine and estuarine habitats by non-indigenous species: mechanism, extent and consequences. En: *American Zoologist*, 37(6), pp.621-632.
- Rup, M.P., Bailey, S.A., Wiley, C.J., Minton, M.S., Miller, A.W., Ruiz, G.M. y MacIsaac, H.J., 2010. Domestic ballast operations on the Great Lakes: potential importance of Lakers as a vector for introduction and spread of nonindigenous species. En: *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 67(2), pp.256–268. DOI: <https://doi.org/10.1139/F09-180>
- Santagata, S., Gasiunaite, Z., Verling, E., Cordell, J., Eason, K., Cohen, J., Bacela, K., Quilez-Badia, G., Johengen, T., Reid, D. y Ruiz, G., 2008. Effect of osmotic shock as a management strategy to reduce transfers of nonindigenous species among low-salinity ports by ships. En: *Aquatic Invasions*, 3, pp.61–76. DOI: <https://doi.org/10.3391/ai.2008.3.1.10>
- Scarabino, F., Menafra, R. y Etchegaray, P., 1999. Presencia de *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) (Gastropoda: Muricidae) en el Río de la Plata. En: *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay*, 11, 40.
- Schwindt, E., Battini, N., Giachetti, C. y Bortolus, A., 2018. Especies exóticas marino-costeras de Argentina / Marine-coastal exotic species of Argentina. Editor: Alejandro Bortolus y Evangelina Schwindt. Puerto Madryn, Argentina. ISBN: 978-987-42-9642-9
- Schwindt, E., Carlton, J.T., Orensanz, J.M., Scarabino, F. y Bortolus, A., 2020. Past and future of the marine bioinvasions along the Southwestern Atlantic. En: *Aquatic Invasions* 15(1), pp.11–29. DOI: <https://doi.org/10.3391/ai.2020.15.1.02>

Ta-Kang, L., Chang, Ch-H. y LiChou, M., 2014. Management strategies to prevent the introduction of non-indigenous aquatic species in response to the Ballast Water Convention in Taiwan. En: *Marine Policy*, 44, pp.187-195. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2013.08.023>

Uruguay. Prefectura Nacional Naval, 2006. *Disposición Marítima N° 109 Directrices para el control y la gestión del agua de lastre de los buques. República Oriental del Uruguay* [En línea]. Montevideo: PNN. [Consulta: 18 de agosto de 2020]. Disponible en: [http://www.armada.mil.uy/ContenidosPDFs/Prena/Dirme/disposiciones\\_maritimas/disposicion\\_maritima\\_109.pdf](http://www.armada.mil.uy/ContenidosPDFs/Prena/Dirme/disposiciones_maritimas/disposicion_maritima_109.pdf)

## Producción, nutrientes, eutrofización y cianobacterias en Uruguay: armando el rompecabezas

Production, nutrients, eutrophication and cyanobacteria blooms in Uruguay: putting puzzle pieces together

Produção, nutrientes, eutrofização e cianobactérias no Uruguai: montando o quebra-cabeça

Guillermo Goyenola<sup>1,\*</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7688-5341>

Carla Kruk<sup>2,3</sup> <https://orcid.org/0000-0003-0760-1186>

Néstor Mazzeo<sup>1,4</sup> <https://orcid.org/0000-0002-3090-2617>

Alejandro Nario<sup>5</sup> <https://orcid.org/0000-0002-7081-4662>

Carlos Perdomo<sup>6</sup> <https://orcid.org/0000-0002-9770-4260>

Claudia Piccini<sup>7</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2762-1953>

Mariana Meerhoff<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6482-1332>

\*Autor de contacto: goyenola@gmail.com

<sup>1</sup> Departamento de Ecología y Gestión Ambiental, Centro Universitario Regional del Este, UDELAR, Maldonado, Uruguay

<sup>2</sup> IECA, Facultad de Ciencias, UDELAR, Montevideo, Uruguay

<sup>3</sup> EFSA, Centro Universitario Regional del Este, UDELAR, Rocha, Uruguay

<sup>4</sup> Instituto SARAS, Maldonado, Uruguay

<sup>5</sup> Asociación Ivy, Montevideo, Uruguay

<sup>6</sup> Departamento de Suelos y Aguas, Facultad de Agronomía, UDELAR, Montevideo, Uruguay

<sup>7</sup> Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

**Recepción:** 11 Agosto 2020 **Aprobación:** 04 Abril 2021

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional.

**Resumen:** Si bien las causas y consecuencias de la eutrofización son múltiples, este artículo analiza aspectos fundamentales en el contexto actual en Uruguay, con especial énfasis en las floraciones cianobacterianas como una de las consecuencias más frecuentes y notorias. El agravamiento de la eutrofización y sus síntomas, que se predicen con el cambio climático; las claves para la reducción de las pérdidas difusas de fósforo hacia el agua superficial en suelos bajo uso agropecuario; y los cambios actuales y futuros en la gobernanza del agua y la gestión ambiental, son algunos de los temas más importantes considerados. En el análisis se identifican también múltiples desafíos, tanto en la generación de conocimiento como en la gestión ambiental asociada.

**Palabras clave:** contaminación, fósforo, agricultura, intensificación sostenible, gobernanza.

**Abstract:** Despite there are multiple causes and consequences of eutrophication, this article analyses key aspects in the current context of Uruguay, emphasizing on cyanobacterial blooms as one of the most frequent and noticeable consequences. The worsening of eutrophication and its symptoms predicted with climate change, the keys for the reduction of diffuse losses of phosphorus with surface runoff on agricultural lands and the ongoing and future changes of water governance and management of the problem are some of the most important issues considered here. In this analysis, we also identify several challenges, both to fill knowledge gaps and in the arena of environmental management.

**Keywords:** pollution, phosphorus, agriculture, sustainable intensification, governance.

**Resumo:** Embora as causas e consequências da eutrofização sejam múltiplas, este artigo analisa aspectos fundamentais no contexto atual no Uruguai, com ênfase especial nas florações de cianobactérias como uma das consequências mais frequentes e notórias. O agravamento da eutrofização e seus sintomas previstos pelas mudanças climáticas, as chaves para reduzir as perdas difusas de fósforo para as águas superficiais em solos sob uso agrícola e as mudanças atuais e futuras na governança da água e gestão ambiental, são algumas das questões mais importantes consideradas. A análise também identifica múltiplos desafios, tanto na geração de conhecimento como na gestão ambiental associada.

**Palavras-chave:** contaminação, fósforo, agricultura, intensificação sustentável, governança.

## INTRODUCCIÓN

La eutrofización es, junto con la fragmentación de los cursos de agua, la problemática más seria y extendida de los ecosistemas acuáticos a nivel mundial y regional (O'Farrell, et al., 2019; Quirós, et al., 2005; Smith, et al., 2006). La misma es favorecida por la ineficiencia en el uso y el manejo de nutrientes en diversas actividades de origen antrópico (Haygarth, et al., 2005). En Uruguay, la

intensificación de la eutrofización fue diagnosticada en las últimas décadas del siglo pasado (De León y Yunes, 2001; Mazzeo, et al., 2002; Pintos, et al., 1986; Sommaruga, et al., 1995). Sin embargo, esta problemática no fue percibida por la población hasta las crisis del agua potable en el área metropolitana asociada a la ciudad de Montevideo en 2013 y en Maldonado en 2015, y la afectación generalizada de las playas en 2019 (González-Madina, et al., 2018; Kruk, et al., 2019; Olano, et al., 2019). Hoy la eutrofización es un fenómeno generalizado que afecta tanto a ecosistemas de agua dulce (Aubriot, et al., 2017; Bonilla, et al., 2015; Goyenola, et al., 2017), como al estuario del Río de la Plata y la costa oceánica (Kruk, et al., 2019; Nagy, et al., 2002).

Si bien las causas y consecuencias de la eutrofización son múltiples, este artículo se enfoca en los aspectos más relevantes en Uruguay: la producción agropecuaria como el mayor contribuyente de nutrientes, las floraciones cianobacterianas como una de las principales respuestas y sus posibles efectos a través de la producción de toxinas, las claves para la reducción de las pérdidas difusas de fósforo, los procesos por los cuales se espera un agravamiento ante el cambio climático, y las fortalezas y debilidades de los ámbitos de gestión de la problemática. El objetivo de este artículo es contribuir a una reflexión interdisciplinaria constructiva para una mejor gestión ambiental a escala país. Esta reflexión es relevante también para la región, dado que el sureste de América del Sur ha experimentado el mismo proceso de intensificación productiva sobre el bioma de pampas y campos desde el año 2000 (Modernel, et al., 2016).

## **FORZANTES DE LA CONTAMINACIÓN POR NUTRIENTES**

### **Actividad agropecuaria e intensificación del uso del suelo**

La producción de alimento es la actividad antrópica que más nutrientes aporta a los ecosistemas acuáticos a nivel mundial (Moss, 2008). El impacto ocurre como una consecuencia no deseada del mal uso de insumos agrícolas y de suplementos alimenticios para ganado y animales de granja, así como también de cambios en la movilización y las vías de transporte de nutrientes (Cordell, et al., 2009; Fowler, et al., 2013; Quinton, et al., 2010; Sims, et al., 1998). Asimismo, en general los sistemas productivos eliminan o debilitan los filtros naturales provistos por los humedales y ecosistemas riparios (Stutter, et al., 2012).

En Uruguay, sólo para el período 2000-2017, se estimó una intensificación agrícola-ganadera de un 65% de la superficie terrestre (Gazzano, et al., 2019). Sin embargo, con mayor o menor intensidad, prácticamente todo el territorio puede considerarse bajo actividad productiva agrícola-ganadera (CLAES, et al., 2008), por lo que los niveles basales de nutrientes (previos a los impactos antrópicos) ya no pueden registrarse.

El análisis de testigos de sedimento de cuerpos de agua de Uruguay correspondientes al Holoceno (últimos 10.000 años) demuestra la aceleración reciente del proceso de eutrofización y su vínculo con actividades antrópicas (García-Rodríguez, et al., 2002; Inda, et al., 2016). Por otra parte, en una comparación de grupos de pequeños arroyos de cabecera bajo usos del suelo contrastantes (agricultura, lechería y ganadería extensiva), los menores niveles de nutrientes se registraron en las cuencas bajo uso ganadero extensivo ( $\leq 1$  cabeza. ha<sup>-1</sup>) (Tabla 1). En dicho estudio la fracción disuelta de fósforo predominó sobre la fracción particulada (Goyenola, et al., 2015), lo que dificulta asociar su movilización exclusivamente al proceso de erosión del suelo. Esto concuerda con otros estudios nacionales (Barreto, et al., 2014; Lizarralde, et al., 2016; Lizarralde, et al., 2014; Perdomo, et al., 2015).

**Tabla 1.** Concentraciones de fósforo y nitrógeno total (PT y NT;  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) en el agua de arroyos en cuencas con diferente uso del suelo predominante, indicando valores mínimos, medianos y máximos.

| Intensidad de uso del suelo | Uso del suelo principal                                     | PT mínima | PT mediana | PT máxima | NT mínima | NT mediana | NT máxima |
|-----------------------------|---|-----------|------------|-----------|-----------|------------|-----------|
| <b>Baja</b>                 | Ganadero extensivo (n=10; i+v)                              | 12        | 67         | 530       | 263       | 636        | 3393      |
| <b>Alta</b>                 | Agrícola intensivo (n=12; i+v)                              | 70        | 157        | 640       | 365       | 1061       | 4563      |
| <b>Alta</b>                 | Agrícola-lechero (n=9; i+v) (1 tambo)                       | 60        | 110        | 425       | 406       | 1267       | 3497      |
| <b>Muy alta</b>             | Agrícola-lechero (n=1; 24 muestreos quincenales) (4 tambos) | 271       | 1210       | 4436      | 240       | 1614       | 5155      |

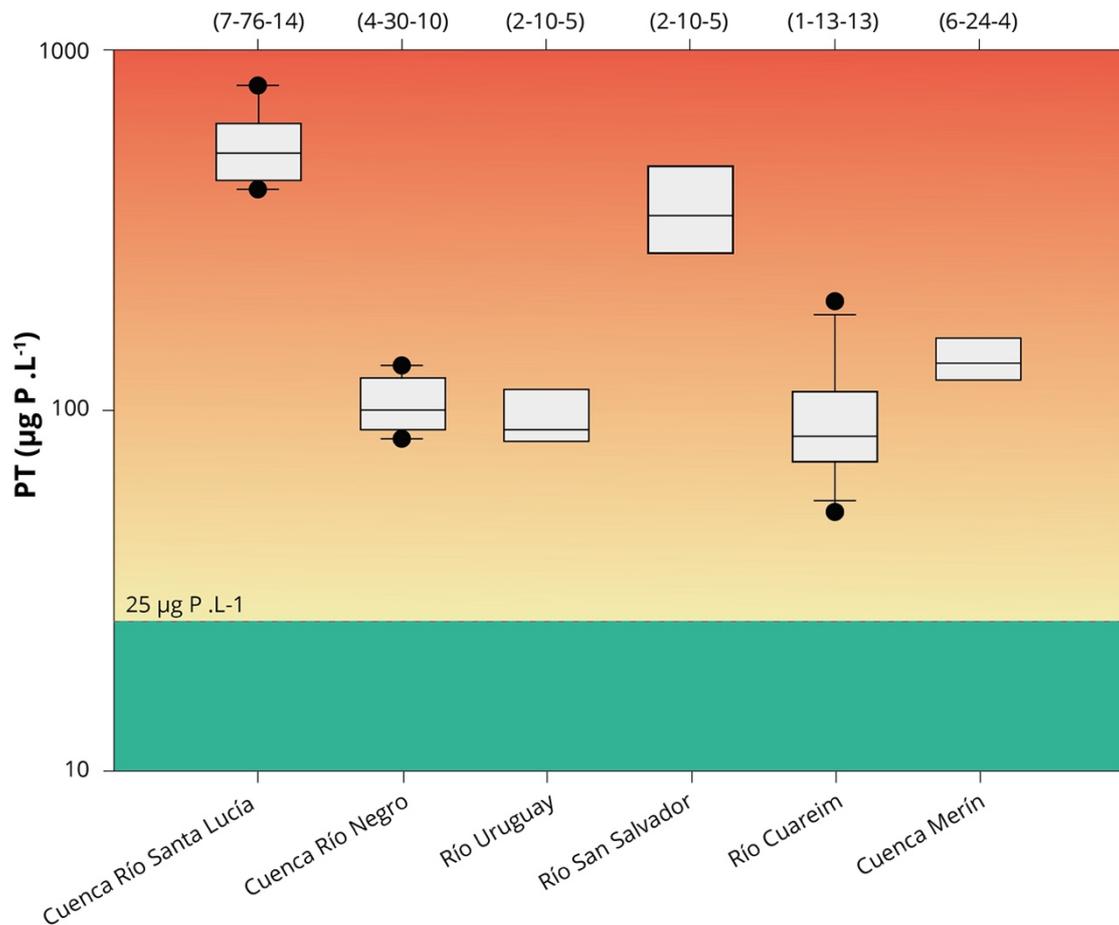
Fuentes: Goyenola, 2016; Goyenola, et al., 2015; Goyenola, et al., 2020. "n" corresponde al número de microcuencas/arroyos estudiados. i+v: muestreos en invierno 2011 y verano 2012.

El hecho de que los aportes de las actividades agrícola-ganaderas sean de origen difuso condiciona la ocurrencia de la eutrofización en todo el territorio. A estos aportes se suman las entradas provenientes de fuentes puntuales, como la actividad industrial y la urbanización, o incluso de sitios con grandes aglomeraciones animales (tambos y feedlots). Esto genera concentraciones elevadas de nutrientes en el agua, espacialmente más localizadas.

En este sentido, la mayor parte de los ecosistemas acuáticos estudiados excede largamente la concentración de  $25 \mu\text{g P L}^{-1}$  de fósforo total (PT) prevista como

valor límite superior en la normativa vigente (Decreto 253/79 y modificativos, Uruguay, 1979). Los muestreos realizados por la ex Dirección Nacional de Medio Ambiente (DINAMA), actual Dirección Nacional de Control y Evaluación Ambiental (DINACEA), en ríos de mayor orden revelan valores de PT muy altos (Figura 1). Lo mismo ocurre con los lagos someros (tipo de lago natural presente en Uruguay) y los embalses (construidos represando arroyos y ríos) usados como fuente de agua para potabilizar. Por ejemplo, en la Laguna del Sauce (Maldonado) se han registrado concentraciones de PT en el entorno de 80-100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Steffen e Inda, 2010), mientras que en Laguna del Cisne (Canelones) la menor concentración medida desde el año 2000 a la fecha fue de 275  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Goyenola, et al., 2017).

El límite de 25  $\mu\text{g PT L}^{-1}$ , establecido en la normativa, puede considerarse exigente para las características locales. Con variaciones según las características climáticas, la geología y la estructura de las tramas tróficas acuáticas en cada sistema, en general los síntomas de la eutrofización son evidentes a partir del entorno de 50-60  $\mu\text{g. PT L}^{-1}$ , mientras que a partir de concentraciones cercanas a 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  los síntomas pueden expresarse en toda su magnitud (Dolman, et al., 2012). Esto es particularmente notorio en cuerpos de aguas quietas, ya que el impacto es mayor cuando el tiempo de residencia del agua es mayor. Al mismo tiempo, el riesgo de eutrofización y la magnitud de los síntomas es mayor en lagos someros que en lagos profundos (Carlson, 1977; Dodds, 2006).



**Figura 1.** Niveles de fósforo total (PT) para diferentes ecosistemas de aguas corrientes uruguayos de acuerdo con los datos abiertos del Observatorio Ambiental Nacional (Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, DINAMA, 2020). Nótese la escala logarítmica en el eje de las ordenadas. La línea sobre el sector verde marca el límite tolerable según la normativa para este tipo de ecosistemas. Cajas: primer, segundo y tercer cuartil; bigotes: primer y noveno decil; puntos negros: *outliers*. Sobre el eje superior se muestra el número de estaciones de muestreo, el número de datos anuales disponibles, y la mayor extensión en años de cada set de datos. Se dispone de un solo dato por año, el que probablemente sea un promedio de varios muestreos (no se reporta la naturaleza del dato en el Observatorio Ambiental Nacional). No fue posible actualizar los datos en marzo de 2021, ya que el observatorio se encuentra fuera de servicio.

Sin ignorar el rol del nitrógeno como nutriente asociado al proceso de eutrofización (Chorus y Spijkerman, 2021; Paerl, et al., 2016; Schindler, et al., 2016), aquí se pone énfasis en el fósforo por considerarlo de mayor relevancia para la situación actual de Uruguay (Bonilla, et al., 2015; Goyenola, et al., 2020; González-Madina, et al., 2018; Goyenola, 2016). Este diagnóstico puede tomarse

como válido para gran parte de la región del Río de la Plata, dependiendo de las características biogeoquímicas y los usos del suelo en las cuencas consideradas (Feijóo, et al., 1999; Feijóo y Lombardo, 2007).

### **Cambio climático y eutrofización**

En los últimos años, se ha alcanzado en la comunidad científica especializada un consenso en cuanto a que el cambio climático potencia la eutrofización y sus síntomas mediante varios procesos (Moss, et al., 2011; Paerl y Huisman, 2008; Li et al., 2021). Se espera que en zonas donde aumenten las precipitaciones ocurra intensificación agrícola y, por el contrario, se esperaría una disminución de la intensidad agrícola en zonas cálidas y mediterráneas debido a una menor disponibilidad de agua (IPCC, 2007; Olesen y Bindi, 2002). Como consecuencia, la creación de embalses probablemente se acelerará en zonas cálidas y mediterráneas (incluso en Uruguay, a partir del impulso dado por la aprobación de la Ley N° 19553 sobre riego con destino agrario, Uruguay, 2017), con la consecuente potenciación de la eutrofización asociada a los embalses (Illiarze, 2015).

En regiones donde se predice un aumento de la precipitación media, se espera un aumento de la escorrentía superficial y una mayor carga de PT ingresando a los cursos de agua (Jeppesen, et al., 2009; Ockenden, et al., 2017). En consecuencia, incluso manteniendo la extensión e intensidad actual de las actividades productivas en las cuencas, se predice un aumento de hasta un 30% de las cargas de PT en invierno para el 2050, independientemente de los usos del suelo (Ockenden, et al., 2017). Asimismo, se espera una mayor carga externa de nitrógeno (Jeppesen, et al., 2011), así como de materia orgánica disuelta (Graeber, et al., 2015). Por el contrario, en sitios donde se predice una disminución en las precipitaciones medias, la disminución en la escorrentía (Giorgi y Lionello, 2008) promoverá que las cargas de nutrientes sean menores. Sin embargo, la concentración en el agua puede ser igual o incluso mayor debido a un menor volumen de agua, a una mayor evapotranspiración por el aumento de temperatura (Özen, et al., 2010), así como a una mayor liberación del P acumulado en los sedimentos hacia la columna de agua provocada en condiciones de anoxia (Jeppesen, et al., 2009).

La mayor temperatura determina también una mayor estratificación térmica, lo que favorece a los organismos que pueden regular su posición en la columna de agua, como varios grupos de cianobacterias (Paerl y Huisman, 2008). Como consecuencia directa e indirecta del calentamiento climático se esperan muchos cambios en las comunidades biológicas (Jeppesen, et al., 2014). En particular, se predicen cambios en la comunidad de peces hacia una dominancia de especies de menor tamaño corporal, y por lo tanto con mayor capacidad reproductiva y mayor metabolismo relativo (Lazzaro, 1997; Meerhoff, et al., 2012; Teixeira de

Mello, et al., 2009), lo que lleva a una menor biomasa del zooplancton filtrador (Meerhoff, et al., 2007). Como consecuencia, las microalgas y cianobacterias pasarían a estar aún más débilmente controladas por consumo que en el presente.

Todas las aproximaciones comúnmente utilizadas en estudios de efectos del cambio climático predicen, de manera coherente, un aumento en las floraciones de cianobacterias con el calentamiento climático (Jeppesen, et al., 2014; Taranu, et al., 2015), incluso a igualdad de concentraciones de P en el agua (Kosten, et al., 2012; Meerhoff, et al., 2012). Por lo tanto, se espera una menor resistencia y resiliencia de los cuerpos de agua frente a la eutrofización.

### SÍNTOMAS DE LA EUTROFIZACIÓN: FLORACIONES CIANOBACTERIANAS

Las cianobacterias son los organismos capaces de hacer fotosíntesis más antiguos del planeta y pueden desarrollarse en todos los ambientes acuáticos (Whitton, 2012). Muchas especies pueden fijar el N<sub>2</sub> atmosférico y habitar ecosistemas donde este nutriente es escaso (Vitousek, et al., 2002), así como captar y/o almacenar P en el citoplasma (Li y Dittrich, 2019).

En las condiciones apropiadas, muchas especies pueden generar floraciones: un crecimiento excesivo de sus poblaciones en relación con su densidad original. Un gran número sintetiza uno o más metabolitos perjudiciales para los animales y particularmente para los mamíferos, incluyendo al ser humano (cianotoxinas) (Testai, et al., 2016). Estos compuestos, de naturaleza química diversa, generan los efectos más negativos de las floraciones (Chorus, et al., 2000).

Estas floraciones son un fenómeno extremadamente frecuente de nuestros ecosistemas acuáticos continentales y costeros (Bonilla, et al., 2015; González-Madina, et al., 2018; Kruk, et al., 2019; Vidal y Britos, 2012). Entre las especies tóxicas que forman floraciones en Uruguay se encuentran las del complejo *Microcystis aeruginosa* (en adelante CMA), que frecuentemente generan floraciones nocivas a nivel global (Harke, et al., 2016). Estas cianobacterias tienen un estilo de vida colonial y producen floraciones en agua dulce y salobre (Kruk, et al., 2019; Kruk, et al., 2017; Martínez de la Escalera, et al., 2017), y son potencialmente productoras de microcistina, cianotoxina de la cual se han descrito al menos 100 variantes diferentes que pueden causar la muerte de animales y seres humanos (Harke, et al., 2016). Sus toxinas y los genes que codifican las mismas están presentes en poblaciones de CMA de todo el país, especialmente en embalses y playas de ambientes dulceacuícolas, pudiendo llegar hasta el Océano Atlántico (Bonilla, et al., 2015; González-Piana, et al., 2017; Kruk, et al., 2019; Kruk, et al., 2015; Kruk, et al., 2017; Martínez de la Escalera, et al., 2017). Los mecanismos ecológicos y evolutivos que explican el éxito del

CMA involucran una gran diversidad genética que le permite dominar la comunidad fitoplanctónica bajo diferentes condiciones ambientales (Martínez de la Escalera, et al., 2019). La toxicidad de estas floraciones ha demostrado ser muy alta (Kruk, et al., 2019), revistiendo un elevado riesgo para la salud pública (Vidal, et al., 2017).

En Uruguay ocurren también otros géneros de cianobacterias que causan floraciones tóxicas, entre los que se encuentran *Planktothrix*, *Nodularia*, *Aphanizomenon*, *Dolichospermum* (Aubriot, et al., 2011; Bonilla, et al., 2015; De León y Yunes, 2001; Haakonsson, et al., 2017; Kozlíková-Zapomělová, et al., 2016; Kruk, et al., 2002; Piccini, et al., 2011; Scasso, et al., 2001; Vidal y Britos, 2012) y *Raphidiopsis*, incluyendo a *R. raciborskii* (antes denominada *Cylindrospermopsis raciborskii* (Aguilera, et al., 2018). Especies de estos géneros pueden producir diversas toxinas, tanto microcistinas (*Planktothrix* y algunas especies de *Dolichospermum*) como nodularinas (*Nodularia*), saxitoxinas (*Raphidiopsis* y especies de *Aphanizomenon*) y anatoxinas (*Dolichospermum*).

### Efectos de las cianobacterias sobre la salud

Se estima que el 75% de las floraciones de cianobacterias en nuestra región son productoras de cientos de variedades de cianotoxinas conocidas que ocurren mezcladas con variedades desconocidas (Giannuzzi, et al., 2017). Los más vulnerables son los niños y adultos inmunodeprimidos, y aquellos con mayor grado de exposición (deportistas náuticos, guardavidas). Las vías de exposición incluyen el contacto directo con el cuerpo (piel, mucosas, oídos, ojos), la aspiración (inhalación), la ingestión accidental de agua o de sedimentos, el consumo de agua o de suplementos alimenticios contaminados y de productos pesqueros provenientes de ambientes con floraciones (peces, mariscos, algas) o regados con agua con cianotoxinas (Giannuzzi, et al., 2017; Testai, et al., 2016), así como el ingreso por vía parenteral por hemodiálisis (Azevedo, et al., 2002). Todas las cianotoxinas afectan piel y mucosas, y son varios los órganos y sistemas blanco que incluso son afectados simultáneamente (sistema inmune, pulmones, riñones, estómago, esófago, colon, y tracto gastrointestinal) (Giannuzzi, et al., 2017). Las microcistinas, además del hígado, afectan todo el tracto gastrointestinal y el sistema inmune, los pulmones y el sistema nervioso (McLellan y Manderville, 2017; Preece, et al., 2017). Los efectos pueden ser agudos (exposición a altas concentraciones) o crónicos (exposición periódica a bajas concentraciones). Ambos efectos pasan muchas veces desapercibidos por parte de especialistas de la salud y de los propios afectados; especialmente los efectos crónicos, ya que presentan síntomas inespecíficos (Giannuzzi, et al., 2017). Varios trabajos demuestran la existencia de efectos en la salud humana como resultado de la exposición crónica a cianotoxinas (Chen, et al., 2009; Li y Dittrich, 2019, McLellan y Manderville, 2017), y por consumo de peces y mariscos de agua dulce o salobre (Poste, et al., 2011), incluso en zonas costeras marinas

(Gibble, et al., 2016).

En Uruguay se han registrado dos casos confirmados de intoxicación aguda por cianotoxinas, ambos por recreación. En 2007, en el Embalse de Salto Grande, fue afectado un deportista adulto (Giannuzzi, et al., 2011); mientras que, en el verano de 2015, en las playas del este de Montevideo (Carrasco y Malvín) fue afectada una niña de 20 meses. La niña presentó síntomas gastrointestinales y fallas graves en el hígado que requirieron un trasplante por hepatitis fulminante por cianotoxinas (Vidal, et al., 2017). En ambos casos, los diagnósticos primarios fueron equivocados (estrés y hepatitis autoinmune, respectivamente), lo que destaca la invisibilidad del riesgo de exposición a floraciones y la falta de conexión entre la información ambiental y el sistema de atención en salud. Uruguay no realiza registro de casos de afectación de salud por exposición a cianobacterias en ninguna de sus formas. Además, las cianotoxinas no están incluidas de forma explícita en el Reglamento Bromatológico Nacional, incluyendo recursos pesqueros, lo cual dificulta no sólo la concientización de la población, sino también el conocimiento de su impacto en la salud pública. A nivel de producción animal, se comparte la preocupación a partir de varios casos de muerte de animales que abrevaron en aguas con floraciones (Bianchi, 2020).

### **¿CONTROL DE LA EUTROFIZACIÓN O CONTROL DE SUS SÍNTOMAS?**

Esperar a que los síntomas de la eutrofización se expresen en toda su intensidad es una mala opción, ya que la rehabilitación o restauración es muy compleja y costosa, entre otras cosas, porque el proceso presenta una lógica acumulativa y resiliente. Aun en los casos en que se ha logrado un descenso de los niveles de nutrientes hasta los niveles anteriores a la ocurrencia de síntomas notorios, la problemática suele persistir debido a la carga interna de nutrientes (Søndergaard, et al., 2003), los cambios ocurridos en la trama trófica (Jeppesen, et al., 2014) y a que las cianobacterias generan condiciones que facilitan su perpetuación (Ger, et al., 2014; Li, et al., 2021). Si se pretende observar resultados en un período acotado (años, lustros o décadas), generalmente no resulta suficiente controlar las fuentes de nutrientes a escala de la cuenca hidrográfica o disminuir su movilización, transporte y/o llegada a los ecosistemas acuáticos (Haygarth, et al., 2005) para alcanzar umbrales de nutrientes mucho menores a los que promovieron los síntomas (Schindler, 2006). Además, debe considerarse que los umbrales de nutrientes para recuperar los ecosistemas deberán ser aún menores en el futuro cercano, dado el efecto sinérgico de la eutrofización con el cambio climático.

Luego de revertir las causas, suele ser necesario manipular comunidades biológicas clave para que se recuperen procesos ecológicos asociados a un estado no eutrófico (Moss, et al., 1996). Estas medidas incluyen reestablecer macrófitas (particularmente especies enraizadas), o controlar su crecimiento

excesivo (Basset, et al., 2014), o modificar la trama trófica para aumentar la presión de consumo sobre el fitoplancton a través de técnicas denominadas biomanipulación. En este caso, la reintroducción de especies de peces potencialmente piscívoras y/o la remoción de peces potencialmente zooplanctívoros o bentívoros, repercuten positivamente sobre la calidad de agua (Jeppesen, et al., 2012). Estas medidas requieren múltiples intervenciones si no se controla la carga externa e interna de nutrientes y su éxito varía enormemente según el contexto climático y biogeográfico (Jeppesen, et al., 2007, Jeppesen, et al., 2012).

### **Bases conceptuales para la reducción de las pérdidas difusas de fósforo desde suelos bajo uso agropecuario**

En el control y manejo de la eutrofización, los mayores avances a nivel internacional se observan en relación con los aportes puntuales, debido a las tecnologías disponibles y el rol de los Estados en la provisión de servicios básicos de agua y saneamiento. Los grandes desafíos permanecen en el campo del control del aporte difuso.

Las pérdidas difusas de P desde suelos bajo producción agropecuaria convencional se asocian al transporte por escorrentía superficial. De acuerdo con el paradigma vigente hasta unos pocos años atrás, cabría esperar que el P se transportase mayormente en forma particulada (Correll, 1998; Sharpley, et al., 2001). En consecuencia, si se controlara la erosión del suelo, se podrían mantener estas pérdidas difusas en niveles aceptables. Sin embargo, resultados más recientes a nivel internacional indican que bajo siembra directa donde prima la aplicación de P en superficie, las pérdidas solubles son muy altas (Jarvie, et al., 2017). Esto se condice con hallazgos a nivel nacional sobre las fracciones de P dominantes en arroyos de cuencas con distintos usos productivos (Aubriot, et al., 2017; Chalar, et al., 2017; Goyenola, 2016, Goyenola et al., 2015). Por tanto, solo el control de la erosión no es suficiente para mantener estas pérdidas dentro de límites compatibles con una buena calidad del agua (Jarvie, et al., 2017).

Una parte de las pérdidas de P soluble se debe a la pérdida directa del fertilizante, que permanece soluble durante unos meses post-aplicación. De acuerdo con datos empíricos, estas pérdidas pueden llegar hasta el 5% de la dosis de P aplicada, aunque los valores más probables oscilan entre el 1-2% (Perdomo, et al., 2015). Por otra parte, la aplicación continua y durante muchos años de P en superficie produce una estratificación vertical del P fácilmente disponible (denominado P lábil) en zonas bajo siembra directa. En Uruguay se ha reportado aumento del P lábil en superficie (medido como P<sub>Bray1</sub>), entre 4 y 8 veces de lo que resultaría si el P se distribuyera homogéneamente en los primeros 15 cm de suelo, tal como ocurría antes de que se adoptase la siembra

directa en Uruguay a partir de 1999 (Perdomo, et al., 2015). Estudios realizados en unidades de manejo bajo siembra directa en predios lecheros de la cuenca del Río Santa Lucía mostraron que la concentración de P soluble extraído con agua aumentó linealmente con la concentración de P lábil en muestras superficiales de suelo (Bray1; 2,5 cm) ( $r^2$  Pearson = 0,73;  $p < 0,001$ ;  $n=38$ , Perdomo, et al., 2015). Por lo tanto, aunque la práctica de aplicación superficial de P cesara, las pérdidas incrementadas de P soluble desde los suelos agrícolas continuarían durante algunas décadas o incluso cientos de años, según distintas estimaciones teóricas.

### **Cambios y desafíos en los sistemas de gestión de la eutrofización**

Uruguay presenta cambios muy importantes en el análisis y la gestión de la eutrofización vinculados a las transformaciones del sistema de gobernanza del agua. Desde inicios de los años 2000, el país ha navegado desde un modelo fragmentado-jerárquico (conocido como "comando-control") hacia un paradigma de gestión integrada con diversas estructuras puente que promueven la interacción entre actores gubernamentales, académicos y la sociedad civil. La inercia del sistema es muy grande por múltiples factores, pero la eutrofización ha actuado como un factor externo acelerando las transformaciones (Mazzeo, et al., 2019; Trimble, et al., 2020; Trimble y Mazzeo, 2020).

### **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

A pesar de que se contaba con diagnósticos técnicos concluyentes, las crisis generadas por la afectación del agua potable entre 2013 y 2015 fueron el factor que posibilitó la aprobación de planes de acción tendientes a proteger la calidad ambiental y la disponibilidad de las fuentes de agua en Uruguay. Estos eventos dispararon también multimillonarias inversiones para mejorar tanto los sistemas de potabilización como de tratamiento de aguas residuales.

En lo que va de este siglo, el sistema productivo agrícola-ganadero ha aumentado su intensidad e incrementado su eficiencia (Uruguay. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, DIEA, 2019), incorporando prácticas de conservación de suelos que mejoraron la sustentabilidad ambiental del sector (Ley N° 15.239 y decretos reglamentarios, Uruguay 1981, 1990, 2004 y 2008). No obstante, las cargas de nutrientes exportadas hacia los ecosistemas acuáticos han aumentado significativamente. La prueba más concluyente es que la eutrofización se ha instalado como un problema ambiental generalizado y de gran magnitud en Uruguay, habiendo provocado consecuencias negativas y a gran escala para la potabilización para consumo humano, las actividades recreativas y el turismo, además de para la biodiversidad acuática.

La escala de las floraciones cianobacterianas potencialmente tóxicas, ocurridas durante la última década, muestra que su magnitud y frecuencia están en pleno aumento, lo que concuerda con: a) la elevada biodisponibilidad de P, dada por las altas concentraciones y por el predominio de la fracción disuelta; b) el enriquecimiento desproporcionado del P respecto al N con la intensidad productiva actual, que favorece a las especies capaces de fijar  $N_{2(g)}$  atmosférico; c) la baja capacidad de control natural por consumo (herbivoría), dada por las características de las redes tróficas subtropicales, y d) los efectos predichos del cambio climático. En este contexto, encontrar el compromiso adecuado entre la producción de alimentos y la generación de divisas, por un lado, y la conservación de los ecosistemas y disponer de agua adecuada para potabilizar, por otro, es uno de los mayores retos que enfrenta nuestra sociedad actualmente (Meerhoff y Bernardi, 2018).

Aunque el tema ha sido profusamente discutido en ámbitos técnicos, e incluso en medios de prensa, existe suficiente evidencia científica para asegurar que en Uruguay la eutrofización es una externalidad causada por la actividad agrícola-ganadera (Chalar, et al., 2017; Goyenola, 2016; Goyenola, et al., 2015; Goyenola, et al., 2020) y las carencias de los sistemas de tratamiento de efluentes (Olano, et al., 2019). Cualquiera de los dos tipos de aportes por sí solos puede generar condiciones de eutrofización en el Uruguay actual, por lo tanto, preguntarse cuál de los aportes es el más importante (difuso vs. puntual) no es pertinente cuando el objetivo es controlar la problemática a escala país. La reciente intensificación de la eutrofización deriva de factores como la baja eficiencia en el uso de nutrientes, y los efectos no intencionales de las prácticas productivas conservacionistas del suelo que favorecen la movilización y el transporte del fósforo soluble por escorrentía superficial (Chalar, et al., 2017; Uruguay. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, DIEA, 2019; Goyenola, 2016; Goyenola, et al., 2015; Goyenola, et al., 2020; Jarvie, et al., 2017; Perdomo, et al., 2015). A lo anterior se le suma un escenario de cambios en los regímenes de precipitación (Bidegain, et al., 2013), que afecta la magnitud de los procesos biogeoquímicos a escala del paisaje (Jeppesen, et al., 2009).

Para minimizar la carga de fósforo exportado por las actividades productivas es necesario ajustar las aplicaciones de fertilizantes a dosis racionales (dosis recomendadas por cultivo según niveles de nutrientes en suelo y planta), e incorporar el fertilizante fosfatado por debajo de la zona de mezclado del suelo, es decir, la capa superficial de menos de 3 cm donde el agua de escurrimiento interacciona con el suelo y con el P soluble proveniente del fertilizante (Jarvie, et al., 2017; Smith, et al., 2015). Debe considerarse la implementación de la inversión esporádica del suelo con arado de reja y vertedera (Baker, et al., 2017; Smith, et al., 2017) para eliminar la estratificación vertical del fósforo y la saturación en superficie, así como para disminuir la compactación y aumentar la

infiltración. La aplicación combinada de estas medidas debería sumarse al mantenimiento de las medidas para el control de la erosión del suelo.

En los casos donde la acumulación de P lábil se extiende en profundidad en el suelo, la inversión del suelo ya no sería efectiva; por lo que, además de suspender la fertilización, habría que promover la extracción paulatina del P lábil mediante cultivos ("catch crops"; Eghball, et al., 2003). Aunque los estudios a escala de campo aún son incipientes, otras medidas para reducir el P lábil incluyen la aplicación de productos químicos al suelo para transformarlo rápidamente a formas menos biodisponibles (Penn, et al., 2012), o eventualmente, combinar estas dos últimas prácticas (Schärer, et al., 2007).

El reciclaje de nutrientes intrapredial, por ejemplo, mediante la utilización de abono de estiércol, se realiza habitualmente en otros países (Jeppesen, et al., 2011). Esta estrategia es particularmente relevante dado que aún en condiciones con mínimo impacto relativo, como la actividad ganadera extensiva tradicional en los pastizales de la región del Río de la Plata (Modernel, et al., 2016), los niveles de PT en los cursos aguas abajo exceden con frecuencia tanto el estándar (exigente) previsto en la normativa uruguaya, como límites aceptables desde un punto de vista académico (más flexibles) (Carlson, 1977, Lamparelli, 2004). Los sistemas productivos que durante muchos años mantienen balances de P positivos inexorablemente generan problemas de eutrofización de las aguas (Powers, et al., 2016). Por ello, todas las medidas descritas son válidas en el corto y mediano plazo. La solución a largo plazo es, incluso dentro del paradigma de producción convencional, transitar hacia sistemas productivos con balances de P neutros o negativos (Peterson, et al., 2017; Reid, et al., 2019; Ruane, et al., 2014). Dada la magnitud de la eutrofización, para lograr revertir la tendencia a mediano plazo (e inclusive para lograr mantener la calidad del agua en los niveles actuales de impacto), es imprescindible aplicar medidas a escala de cuenca hidrográfica que aumenten la retención de nutrientes. En este marco, la conservación y recuperación de humedales y zonas riparias cumple un rol fundamental (Stutter, et al., 2012).

Para ajustar los sistemas productivos y promover la resiliencia natural de los ecosistemas, es clave la generación de conocimiento original específico y la innovación ajustada a la dinámica de nuestros ecosistemas y así contribuir a la toma de decisiones informada y basada en el mejor conocimiento científico disponible (Tabla 2) (Sharpley, et al., 2015).

En Uruguay, la ausencia de sistemas de monitoreo suficientes a escala país y de evaluaciones sólidas de los impactos generados por las transformaciones productivas (inclusive sobre la salud pública) limitan, tanto el diseño de medidas de gestión adecuadas, como el manejo de la incertidumbre inherente a estas

problemáticas y la capacidad de aprendizaje (generalmente asociados al aprender haciendo) (Kleinman, et al., 2015; Pahl-Wostl, 2015). Con excepción del registro de caudales, los sistemas de monitoreo en Uruguay no son de larga duración, no están diseñados siguiendo un enfoque integral (por ejemplo, el monitoreo de calidad suele no considerar cantidad del agua, y viceversa), carecen de cobertura en grandes sectores del territorio, se encuentran preferentemente enfocados en ecosistemas de aguas corrientes de alto orden (grandes ríos), no incluyen ecosistemas de referencia (cuerpos de agua con el menor impacto posible), y no permiten extrapolar información a ecosistemas no monitoreados. Además, la evaluación de la calidad del agua se basa casi exclusivamente en propiedades físico-químicas, sin considerar bioindicadores o atributos ecosistémicos (Mazzeo, et al., 2019). Estos aspectos están incluidos desde hace décadas en normativas internacionales, como la Directiva Marco del Agua de la Unión Europea, 2000/60/CE (Unión Europea, 2000).

La generación de conocimiento es un paso ineludible (Tabla 2). No obstante, la gestión de esta problemática es un desafío fundamentalmente organizacional, que requiere modificaciones importantes de un sistema de gobernanza centralista y que, aunque supera la fragmentación en el análisis y toma de decisión, no lo hace en el campo de su aplicación, control y fiscalización. En este sentido, la creación del Ministerio de Ambiente en 2020 genera una oportunidad y un desafío para mantener y profundizar los pasos positivos y para realizar los cambios necesarios para enfrentar la eutrofización en el Uruguay. Estas transformaciones deberían ser acompañadas por procesos de descentralización y de espacios multiactorales efectivos que promuevan la interacción interinstitucional e internivel, y el intercambio entre los dominios disciplinares y sistemas de conocimiento.

**Tabla 2.** Algunos aspectos clave en los que el Uruguay podría y debería avanzar en los próximos años con el objetivo de disminuir la eutrofización y sus impactos.

| Desarrollo del conocimiento  | Gestión ambiental y gobernanza  |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- Biogeoquímica de nutrientes y balance de masa a escala de predio y cuenca hidrográfica</li> <li>- Caudales ambientales integrando funcionamiento ecosistémico.</li> <li>- Estructura, funcionamiento y servicios ecosistémicos brindados por cuerpos de agua en distintas condiciones de impacto.</li> <li>- Determinación de la capacidad de carga en cuencas de distintos tamaños y usos.</li> <li>- Diseño y testeado de métodos y protocolos de secuestro de nutrientes excedentes en suelos y aguas.</li> <li>- Diseño y manejo de filtros y trampas de nutrientes en el paisaje.</li> <li>- Estrategias locales de control y gestión de la eutrofización.</li> <li>- Establecimiento de microcuencas productivas experimentales, gestionadas bajo las reglas del mercado.</li> <li>- Evaluación de los efectos ambientales de formas alternativas de producción.</li> <li>- Análisis epidemiológicos del efecto de las cianotoxinas, principalmente por exposición recreativa y consumo.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fortalecimiento de sistemas de monitoreo, análisis y procesamiento de datos.</li> <li>- Evaluación integral de efectividad y costos (económicos y ambientales) de las medidas aplicadas, como base para su reformulación y ajuste.</li> <li>- Diseño de un sistema de gestión capaz de aprender y adaptarse a escenarios de crisis, conflictos e intereses contrapuestos.</li> <li>- Fortalecimiento de la estructura de gobernanza en un marco de gestión integrada-adaptativa y con sustento en la participación de diferentes actores.</li> <li>- Incorporación en la normativa del concepto de carga tolerable de nutrientes específica para cada cuenca.</li> <li>- Promoción de prácticas productivas más amigables con el ambiente, tales como la agroecología y la economía circular.</li> <li>- Inclusión explícita de las cianotoxinas en la normativa de inocuidad de alimentos, incluyendo recursos pesqueros (Reglamento Bromatológico del Uruguay).</li> <li>- Incorporación en el sistema de salud de un protocolo de registro de casos de afectación por exposición a cianobacterias.</li> </ul> |
| <b>Formación de recursos humanos:</b>  |   |
| <p>Técnicos de campo, técnicos de laboratorio (físicoquímicos y biológicos) y especialistas en análisis de datos; investigadores especializados y gestores.</p>  |   |

## AGRADECIMIENTOS

Este manuscrito integra aportes realizados por un grupo de académicos y gestores ambientales en la mesa redonda organizada en el X Congreso de la Red Latinoamericana de Ciencias Ambientales en marzo de 2020 (Maldonado, Uruguay). Los autores agradecen muy especialmente a la Red y a los organizadores del X Congreso. Queremos también agradecer a Diego Michelini

y Micaela Trimble por los aportes realizados. Goyenola, Kruk, Mazzeo, Meerhoff, Piccini y Perdomo son apoyados por el SNI-ANII. Meerhoff y Goyenola fueron apoyados por el Consejo Danés de Investigación Independiente, ANII-FCE (2009-2749), Meerhoff contó con el apoyo del premio nacional L’Oreal-UNESCO para las Mujeres en la Ciencia con apoyo de DICYT y de CSIC, Artículo 2 2019 proyecto: De la Naturaleza a tu mesa: huella ambiental, social y económica de la producción de alimentos en Uruguay. Mazzeo por el Programa de Grupos de Investigación-CSIC y Proyecto Governagua. Perdomo contó con el apoyo del Fondo María Viñas FMV\_3\_2011\_1\_7088, European Union-INCOCT-2006-032387, INIA-FPTA 301 2013, beca ANII Posgrados 2012\_1\_8898, MGAP-DACC, CONICYT Udelar, UdelaR (becas posgrado y visita científica). Piccini contó con el apoyo del proyecto FCE\_1\_2019\_1\_156308 (ANII). En el artículo se han incorporado contribuciones en el área de la gobernanza del agua en tres proyectos en pleno desarrollo: “Proceso de construcción de la gestión integrada de recursos hídricos en Uruguay, estado de situación y controversias”, financiado por el Global Water Partnership (GWP); “Transformando la gobernanza del agua en América del Sur: de la reacción a la adaptación y la anticipación”, financiado por el Instituto Interamericano para la Investigación del Cambio Global (IAI) SGP-HW 056; y “Bases para el diseño de un sistema nacional de monitoreo de recursos hídricos desde la perspectiva de cuencas virtuales” (ANII, FSDA 1 2018 1 154610).

## REFERENCIAS

- Aguilera, A., Gómez, E.B., Kaštovský, J., Echenique, R.O. y Salerno, G.L., 2018. The polyphasic analysis of two native *Raphidiopsis* isolates supports the unification of the genera *Raphidiopsis* and *Cylindrospermopsis* (Nostocales, Cyanobacteria). En: *Phycologia*, 57(2), pp.130-146. <https://doi.org/10.2216/17-2.1>
- Aubriot, L., Bonilla, S. y Falkner, G., 2011. Adaptive phosphate uptake behaviour of phytoplankton to environmental phosphate fluctuations. En: *FEMS Microbiology Ecology*, 77, pp.1-16. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01078.x>
- Aubriot, L., Delbene, L., Haakonsson, S., Somma, A., Hirsch, F. y Bonilla, S., 2017. Evolución de la eutrofización en el Río Santa Lucía: influencia de la intensificación productiva y perspectivas. En: *INNOTEK*, 14, pp.7-16. <https://doi.org/10.26461/14.04>
- Azevedo, S.M.F.O., Carmichael, W.W., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R. y Eaglesham, G.K., 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru/Brazil. En: *Toxicology*, 181/182, pp.441-446. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00491-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00491-2)

- Baker, D.B., Johnson, L.T., Confesor, R.B. y Crumrine, J.P., 2017. Vertical stratification of soil phosphorus as a concern for dissolved phosphorus runoff in the lake Erie Basin. En: *Journal of Environmental Quality*, 46, pp.1287-1295. <https://doi.org/10.2134/jeq2016.09.0337>
- Barreto, P., Ernst, O., Bidegáin, P.M. y Perdomo, C., 2014. Cuantificación de la pérdida de fósforo por escorrentía en diferentes rotaciones de suelos de Uruguay [En línea]. En: *Congreso Uruguayo de Suelos*. Colonia, Uruguay (6-8 de agosto de 2014). Colonia: [s.n.]. [Consulta: 01 de agosto de 2020]. Disponible en: <http://www.suelos.com.uy/pdf/58.pdf>
- Basset, A., Baxter, J.M. y Daborn, G.R., 2014. *Report Laguna del Diario. Rehabilitation strategy of the lagoon ecological status* [En línea]. Montevideo: SMRU Marine. [Consulta: 01 de agosto de 2020]. Disponible en: [http://www.maldonado.gub.uy/files/17162\\_2ec0b8\\_REPORTE-FINAL-INGLES.pdf](http://www.maldonado.gub.uy/files/17162_2ec0b8_REPORTE-FINAL-INGLES.pdf)
- Bianchi, C., 2020. *Uriarte: Este gobierno ignoró a los productores rurales. Hay que escucharlos*. [En línea]. Montevideo: Montevideo Portal. [Consulta: 09 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://www.montevideo.com.uy/Noticias/Uriarte--Este-gobierno-ignora-a-los-productores-rurales- Hay-que-escucharlos--uc740016>
- Bidegáin, M., Crisci, C., Del Puerto, L., Inda, H., Mazzeo, N., Taks, J. y Terra, R., 2013. *Clima de cambios, nuevos desafíos de adaptación en Uruguay. Vol. 1 Variabilidad climática de importancia para el sector productivo*. FAO-MGAP. TCP URU/3302 [En línea]. Montevideo: FAO. [Consulta: 09 de agosto de 2020]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/as253s/as253s.pdf>
- Bonilla, S., Haakonsson, S., Somma, A., Gravier, A., Britos, A., Vidal, L., De León, L., Brena, B., Pérez, M., Piccini, C., Martínez De la Escalera, G., Chalar, G., González-Piana, M., Martigani, F. y Aubriot, L., 2015. Cianobacterias y cianotoxinas en ecosistemas límnicos de Uruguay. En: *INNOTEC*, 10, pp.9-22.
- Carlson, R.E., 1977. A Trophic State Index for Lakes. En: *Limnology and Oceanography*, 22, pp.361-369. <https://doi.org/10.4319/lo.1977.22.2.0361>

Chalar, G., Garcia-Pesenti, P., Silva-Pablo, M., Perdomo, C., Olivero, V. y Arocena, R., 2017. Weighting the impacts to stream water quality in small basins devoted to forage crops, dairy and beef cow production. En: *Limnological Ecology and Management of Inland Waters*, 65, pp.76-84.  
<https://doi.org/10.1016/j.limno.2017.06.002>

Chen, J., Xie, P., Li, L. y Xu, J., 2009. First identification of the hepatotoxic microcystins in the serum of a chronically exposed human population together with indication of hepatocellular damage. En: *Toxicological Sciences*, 108, pp.81-89. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp009>

Chorus, I., Falconer, I.R., Salas, H.J. y Bartram, J., 2000. Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. En: *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews*, 3, pp.323-347.  
<https://doi.org/10.1080/109374000436364>

Chorus, I. y Spijkerman, E., 2021. What Colin Reynolds could tell us about nutrient limitation, N:P ratios and eutrophication control. En: *Hydrobiologia*, 848, pp.95-111. <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04377-w>

CLAES, PNUMA y DINAMA, 2008. *GEO Uruguay. Informe del estado del ambiente*. Montevideo: Mosca. 350 pp.

Cordell, D., Drangert, J.O. y White, S., 2009. The story of phosphorus: global food security and food for thought. En: *Global Environmental Change*, 19, pp.292-305. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009>

Correll, D.L., 1998. The role of phosphorus in the eutrophication of receiving waters: a review. En: *Journal of Environmental Quality*, 27, pp.261-266.  
<https://doi.org/10.2134/jeq1998.00472425002700020004x>

De León, L. y Yunes, J.S., 2001. First report of a microcystin-containing bloom of the cyanobacterium *microcystis aeruginosa* in the La Plata River, South America. En: *Environmental Toxicology*, 16, pp.110-112.  
[https://doi.org/10.1002/15227278\(2001\)16:1<110::AID-TOX1012>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/15227278(2001)16:1<110::AID-TOX1012>3.0.CO;2-Z)

Dodds, W.K., 2006. Eutrophication and trophic state in rivers and streams. En: *Limnology and Oceanography*, 51, pp.671-680.  
[https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.1\\_part\\_2.0671](https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.1_part_2.0671)

- Dolman, A.M., Rücker, J., Pick, F.R., Fastner, J., Rohrlack, T., Mischke, U. y Wiedner, C. 2012. Cyanobacteria and Cyanotoxins: The Influence of Nitrogen versus Phosphorus. En: *PLoS ONE*, 7, e38757. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038757>
- Eghball, B., Shanahan, J.F., Varvel, G.E. y Gilley, J.E., 2003. Reduction of high soil test phosphorus by corn and soybean varieties. En: *Agronomy Journal*, 95, pp.1233-1239. <https://doi.org/10.2134/agronj2003.1233>
- Feijóo, C.S., Giorgi, A., García, M.E. y Momo, F., 1999. Temporal and spatial variability in streams of a pampean basin. En: *Hydrobiologia*, 394, pp.41-52. <https://doi.org/10.1023/A:1003583418401>
- Feijóo, C.S. y Lombardo, R.J. 2007. Baseline water quality and macrophyte assemblages in Pampean streams: A regional approach. En: *Water Research*, 41, pp.1399-1410. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.08.026>
- Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M.A., Cape, J.N., Reis, S., Sheppard, L.J., Jenkins, A., Grizzetti, B., Galloway, J.N., Vitousek, P., Leach, A., Bouwman, A.F., Butterbach-Bahl, K., Dentener, F., Stevenson, D., Amann, M. y Voss, M., 2013. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. En: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 368(1621). <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0164>
- García-Rodríguez, F., Mazzeo, N., Sprechmann, P., Metzeltin, D., Sosa, F., Treutler, H.C., Renom, M., Scharf, B. y Gaucher, C., 2002. Paleolimnological assessment of human impacts in Lake Blanca, SE Uruguay. En: *Journal of Paleolimnology*, 28, pp.457-468. <https://doi.org/10.1023/A:1021616811341>
- Gazzano, I., Achkar, M. y Díaz, I., 2019. Agricultural transformations in the southern cone of Latin America: agricultural intensification and decrease of the aboveground net primary production, Uruguay's case. En: *Sustainability*, 11, pp.7011. <https://doi.org/10.3390/su11247011>
- Ger, K.A., L.A. Hansson y M. Lüring, 2014. Understanding cyanobacteria zooplankton interactions in a more eutrophic world. En: *Freshwater Biology*, 59, 1783-1798. doi:10.1111/fwb.12393
- Giannuzzi, L., Petcheneshsky, T. y Hansen, M., 2017. *Cianobacterias como determinantes ambientales de la salud*. Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación.

- Giannuzzi, L., Sedan, D., Echenique, R. y Andrinolo, D., 2011. An acute case of intoxication with cyanobacteria and cyanotoxins in recreational water in Salto Grande Dam, Argentina. En: *Marine Drugs*, 9, pp.2164-2175. <https://doi.org/10.3390/md9112164>
- Gibble, C.M., Peacock, M.B. y Kudela, R.M., 2016. Evidence of freshwater algal toxins in marine shellfish: implications for human and aquatic health. En: *Harmful Algae*, 59, pp.59-66. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.09.007>
- Giorgi, F. y Lionello, P., 2008. Climate change projections for the Mediterranean region. En: *Global and Planetary Change*, 63, pp.9-104. <https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2007.09.005>
- González-Madina, L., Pacheco, J.P., Yema, L., Tezanos, P.D., Levrini, P., Clemente, J., Crisci, C., Lagomarsino, J.J., Méndez, G., Fosalba, C., Goyenola, G. y Mazzeo, N., 2018. Drivers of cyanobacteria dominance, composition and nitrogen fixing behavior in a shallow lake with alternative regimes in time and space, Laguna del Sauce (Maldonado, Uruguay). En: *Hydrobiologia*, 289, pp.61-76. <https://doi.org/10.1007/s10750-018-3628-6>
- González-Piana, M., Fabián, D., Piccardo, A. y Chalar, G., 2017. Dynamics of total microcystin LR concentration in three subtropical hydroelectric generation reservoirs in Uruguay, South America. En: *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 99, pp.488-492. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2195-2>
- Goyenola, G., 2016. *Efectos de la intensidad productiva agrícola sobre la dinámica de macronutrientes en arroyos de cabecera: Una evaluación bajo condiciones climáticas/hidrológicas contrastantes*. Montevideo: UdelaR, Facultad de Ciencias. (Tesis de doctorado).
- Goyenola, G., Meerhoff, M., Teixeira-De Mello, F., González-Bergonzoni, I., Graeber, D., Fosalba, C., Vidal, N., Mazzeo, N., Ovesen, N. B., Jeppesen, E. y Kronvang, B., 2015. Monitoring strategies of stream phosphorus under contrasting climate-driven flow regimes. En: *Hydrology and Earth System Sciences*, 19, pp.4099-4111. <https://doi.org/10.5194/hess-19-4099-2015>
- Goyenola, G., Vidal, N., Acevedo, S., Cabrera, S., Fosalba, C., Teixeira-De Mello, F., Calvo, C., Tesitore, G., Gaucher, L., Iglesias, C., López-Rodríguez, A., Burwood, M., Corrales, N., Olsson, D., Levrini, P., Pacheco, J. P., Capuccio, L. y Urtado, L., 2017. *Sistemas acuáticos canarios. Estado del conocimiento y gestión ambiental. Informe ambiental estratégico*. Canelones: Centro Universitario Regional Este, Universidad de la República, Comuna Canaria.

- Goyenola, G., Graeber, D., Meerhoff, M., Jeppesen, E., Mello, F.D., Vidal, N., Fosalba, C., Ovesen, N.B., Gelbrecht, J., Mazzeo, N. y Kronvang, B., 2020. Influence of farming intensity and climate on lowland stream nitrogen. En: *Water*, 12(4), pp.1021. <https://doi.org/10.3390/w12041021>
- Graeber, D., Boëchat, I.G., Encina-Montoya, F., Esse, C., Gelbrecht, J., Goyenola, G., Gücker, B., Heinz, M., Kronvang, B., Meerhoff, M., Nimptsch, J., Pusch, M. T., Silva, R.C.S., Von Schiller, D. y Zwirnmann, E., 2015. Global effects of agriculture on fluvial dissolved organic matter. En: *Scientific Reports*, 5, pp.16328. <https://doi.org/10.1038/srep16328>
- Haakonsson, S., Rodríguez-Gallego, L., Somma, A. y Bonilla, S., 2017. Temperature and precipitation shape the distribution of harmful cyanobacteria in subtropical lotic and lentic ecosystems. En: *Science of The Total Environment*, 609, pp.1132-1139. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.067>
- Harke, M.J., Steffen, M.M., Gobler, C.J., Otten, T.G., Wilhelm, S.W., Wood, S.A. y Paerl, H.W., 2016. A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. En: *Harmful Algae*, 54, pp.4-20. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.12.007>
- Haygarth, P.M., Condron, L.M., Heathwaite, A.L., Turner, B.L. y Harris, G.P., 2005. The phosphorus transfer continuum: linking source to impact with an interdisciplinary and multi-scaled approach. En: *Science of the Total Environment*, 344, pp.5-14. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.02.001>
- Illiarze, M., 2015. *Embalses como incubadoras de cianobacterias: efecto de la residencia del agua y de la disponibilidad de nutrientes*. Montevideo: UdelaR, Facultad de Ciencias. (Tesis de grado).
- Inda, H., García-Rodríguez, F., Stutz, S., Lopes Figueira, R., Alves De Lima Ferreira, P. y Mazzeo, N., 2016. Discriminating between natural and human-induced shifts in a shallow coastal lagoon: A multidisciplinary approach. En: *Anthropocene*, 16, pp.1-15. <https://doi.org/10.1016/j.ancene.2016.09.003>
- IPCC, 2007. Summary for policymakers. En: Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Enhen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M. y Miller, H.L., eds. *Climate change 2007: the physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change*. Nueva York: Cambridge University Press.

- Jarvie, H.P., Johnson, L.T., Sharpley, A.N., Smith, D.R., Baker, D.B., Bruulsema, T.W. y Confesor, R., 2017. Increased soluble phosphorus loads to lake erie: unintended consequences of conservation practices? En: *Journal of Environmental Quality*, 46, pp.123-132.  
<https://doi.org/10.2134/jeq2016.07.0248>
- Jeppesen, E., Kronvang, B., Meerhoff, M., Søndergaard, M., Hansen, K.M., Andersen, H.E., Lauridsen, T.L., Beklioglu, M. y Olesen, A.O.J.E., 2009. Climate change effects on runoff, phosphorus loading and lake ecological state, and potential adaptations. En: *Journal of Environmental Quality*, 38, pp.1930-1941. <https://doi.org/10.2134/jeq2008.0113>
- Jeppesen, E., Kronvang, B., Olesen, J., Audet, J., Søndergaard, M., Hoffmann, C., Andersen, H., Lauridsen, T., Liboriussen, L., Larsen, S., Beklioglu, M., Meerhoff, M., Özen, A. y Özkan, K., 2011. Climate change effects on nitrogen loading from cultivated catchments in Europe: implications for nitrogen retention, ecological state of lakes and adaptation. En: *Hydrobiologia*, 663, pp.1-21. <https://doi.org/10.1007/s10750-010-0547-6>
- Jeppesen, E., Meerhoff, M., Davidson, T.A., Trolle, D., Søndergaard, M., Lauridsen, T.L., Beklioglu, M., Brucet, S., Volta, P., González-Bergonzoni, I. y Nielsen, A., 2014. Climate change impacts on lakes: an integrated ecological perspective based on a multi-faceted approach, with special focus on shallow lakes. En: *Journal of Limnology*, 73, pp.84-107.  
<https://doi.org/10.4081/jlimnol.2014.844>
- Jeppesen, E., Meerhoff, M., Jacobsen, B.A., Hansen, R.S., Søndergaard, M., Jensen, J.P., Lauridsen, T., Mazzeo, N. y Branco, C.C., 2007. Restoration of shallow lakes by nutrient control and biomanipulation the successful strategy varies with lake size and climate. En: *Hydrobiologia*, 581, pp.269-285.
- Jeppesen E., Søndergaard, M., Lauridsen, T.L., Davidson, T.A., Liu, Z., Mazzeo, N., Trochine, C., Ozkan, K., Jensen, H.S., Trolle, D., Landkildehus, F., Starling, F., Larsen, S.E., Lazzaro, X. y Meerhoff, M., 2012. Biomanipulation as a restoration tool to combat eutrophication – recent advances and future challenges. En: *Advances in Ecological Research*, 47, pp.411-488.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398315-2.00006-5>
- Kleinman, P.J.A., Sharpley, A.N., Withers, P.J.A., Bergström, L., Johnson, L.T. y Doody, D.G., 2015. Implementing agricultural phosphorus science and management to combat eutrophication. En: *AMBIO*, 44, pp.297-310.  
<https://doi.org/10.1007/s13280-015-0631-2>

- Kosten, S., Huszar, V.L.M., Bécares, E., Costa, L.S., Van Donk, E., Hansson, L.A., Jeppesen, E., Kruk, C., Lacerot, G., Mazzeo, N., De Meester, L., Moss, B., Lürling, M., Nöges, T., Romo, S. y Scheffer, M., 2012. Warmer climates boost cyanobacterial dominance in shallow lakes. En: *Global Change Biology*, 18, pp.118-126. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02488.x>
- Kozlíková-Zapomělová, E., Ferrari, G. y Del Carmen Pérez, M., 2016. *Dolichospermum uruguayense* sp. nov., a planktic nostocacean cyanobacterium from the Lower Uruguay River, South America. En: *Fottea*, 16, pp.189-200. <https://doi.org/10.5507/fot.2016.009>
- Kruk, C., Martínez, A., Martínez De La Escalera, G., Trinchin, R., Manta, G., Segura, Á.M., Piccini, C., Brena, B., Fabiano, G., Pérez, M., Gabito, L., Alcántara, I. y Yannicelli, B., 2019. Exceptional bloom of toxic cyanobacteria on the Uruguayan coast, summer 2019. En: *INNOTEK*, 18, pp.36-68. <https://doi.org/10.26461/18.06>
- Kruk, C., Mazzeo, N., Lacerot, G. y Reynolds, C., 2002. Classification schemes for phytoplankton: a local validation of a functional approach to the analysis of species temporal replacement. En: *Journal of Plankton Research*, 24, pp.901-912. <https://doi.org/10.1093/plankt/24.9.901>
- Kruk, C., Segura, A., Nogueira, L., Carballo, C., Martínez De La Escalera, G., Calliari, D., Ferrari, G., Simoens, M., Cea, J., Alcántara, I., Vico, P., Míguez, D. y Piccini, C., 2015. Herramientas para el monitoreo y sistema de alerta de floraciones de cianobacterias nocivas: Río Uruguay y Río de la Plata. En: *INNOTEK*, 10, pp.23-29.
- Kruk, C., Segura, A.M., Nogueira, L., Alcántara, I., Calliari, D., Martínez De La Escalera, G., Carballo, C., Cabrera, C., Sarthou, F., Scavone, P. y Piccini, C., 2017. A multilevel trait-based approach to the ecological performance of *Microcystis aeruginosa* complex from headwaters to the ocean. En: *Harmful Algae*, 70, pp.23-36. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.10.004>
- Lamparelli, M.C., 2004. *Grus de trofia en corpos d'água de Estado de Sao Paulo: avilacao dos métodos de monitoramento*. San Pablo: Universidade de Sao Paulo. (Tesis de Doctorado).
- Lazzaro, X., 1997. Do the trophic cascade hypothesis and classical biomanipulation approaches apply to tropical lakes and reservoirs? En: *Verhandlungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, 26(2), pp.719-730. <https://doi.org/10.1080/03680770.1995.11900811>

- Li, J. y Dittrich, M., 2019. Dynamic polyphosphate metabolism in cyanobacteria responding to phosphorus availability. En: *Environmental Microbiology*, 21, pp.572-583. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14488>
- Li, Y., J. Shang, C. Zhang, W. Zhang, L. Niu, L. Wang, H. Zhang, 2021. The role of freshwater eutrophication in greenhouse gas emissions: A review. En: *Science of The Total Environment*, 768, 144582, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144582>.
- Lizarralde, C., Ciganda, V., Baethgen, W. y Quincke, A., 2016. Pérdida de nutrientes en agua de escurrimiento en sistemas de rotaciones contrastantes. En: *Revista INIA*, 46, pp.41-43. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/6134/1/Revista-INIA-Uruguay-n.-46.-p.-41-43.-2016.pdf>
- Lizarralde, C., Rubio, V. y Sawchik, J., 2014. Relación entre las variables climáticas y del suelo con la pérdida de fósforo por escorrentía [En línea]. En: *Congreso Uruguayo de Suelos*. Colonia, Uruguay (6-8 de agosto de 2014). Colonia: [s.n.]. [Consulta: 01 de agosto de 2020]. Disponible en: <http://www.suelos.com.uy/pdf/74.pdf>
- Martínez De La Escalera, G., Kruk, C., Segura, A.M., Nogueira, L., Alcántara, I. y Piccini, C., 2017. Dynamics of toxic genotypes of *Microcystis aeruginosa* complex (MAC) through a wide freshwater to marine environmental gradient. En: *Harmful Algae*, 62, pp.73-83. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.11.012>
- Martínez De La Escalera, G., Segura, A.M., Kruk, C., Ghattas, B. y Piccini, C., 2019. Genotyping and functional regression trees reveals environmental preferences of toxic cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa* complex) along a wide spatial gradient. En: *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2019.12.20.885111>
- Mazzeo, N., Clemente, J., García-Rodríguez, F., Gorga, J., Kruk, C., Larrea, D., Meerhoff, M., Quintans, F., Rodríguez-Gallego, L. y Scasso, F., 2002. Eutrofización: causas, consecuencias y manejo. En: Domínguez, A. y Prieto, R.G., eds. *Perfil ambiental del Uruguay*. Montevideo: Nordan. pp. 39-55.

- Mazzeo, N., Zurbriggen, C., Steffen, M., Barquín, J., Gadino, I., Díaz, I., Ciganda, A. L., Goyenola, G. y Trimble, M., 2019. Descentralización y centralización en la gestión del agua en Uruguay. En: Cardarello, A. y Ferla, P., eds. *Descentralización en Uruguay. Propuestas para avanzar en la agenda*. Montevideo: Konrad-Adenauer-Stiftung e.V. Fundación Konrad-denauer Oficina Uruguay. pp. 59-72.
- Mclellan, N.L. y Manderville, R.A., 2017. Toxic mechanisms of microcystins in mammals. En: *Toxicology Research*, 6, pp.391-405.  
<https://doi.org/10.1039/c7tx00043j>
- Meerhoff, M. y Bernardi, R. 2018. Climate Report from Uruguay. En: *Performance Research*, 23, pp. 56-58.  
<https://doi.org/10.1080/13528165.2018.1495949>
- Meerhoff, M., Clemente, J.M., Teixeira-De Mello, F., Iglesias, C., Pedersen, A.R. y Jeppesen, E., 2007. Can warm climate-related structure of littoral predator assemblies weaken the clear water state in shallow lakes? En: *Global Change Biology*, 13, pp.1888-1897. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2007.01408.x>
- Meerhoff, M., Teixeira De Mello, F., Kruk, C., Alonso, C., González-Bergonzoni, I., Pacheco, J. P., Lacerot, G., Arim, M., Beklioglu, M., Brucet, S., Goyenola, G., Iglesias Frizzera, C., Mazzeo, N., Kosten, S. y Jeppesen, E., 2012. 4 - Environmental warming in shallow lakes: a review of potential changes in community structure as evidenced from space-for-time substitution approaches. En: *Advances in Ecological Research*, 46, pp.259-349.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396992-7.00004-6>
- Modernel, P., Rossing, W.A.H., Corbeels, M., Dogliotti, S., Picasso, V. y Tiftonell, P., 2016. Land use change and ecosystem service provision in Pampas and Campos grasslands of southern South America. En: *Environmental Research Letters*, 11, 113002. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/11/11/113002>
- Moss, B., 2008. Water pollution by agriculture. En: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 363, pp.659-666.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2176>
- Moss, B., Kosten, S., Meerhoff, M., Battarbee, R.W., Jeppesen, E., Mazzeo, N., Havens, K., Lacerot, G., Liu, Z., De Meester, L., Paerl, H. y Scheffer, M., 2011. Allied attack: climate change and nutrient pollution. En: *Inland Waters*, 1, pp.101-105. <https://doi.org/10.5268/IW-1.2.359>

- Moss, B., Madgwick, J. y Phillips, G., 1996. *A guide to the restoration of nutrient-enriched shallow lakes*. Norwich: Broads Authority. 178 pp.
- Nagy, G.J., Gómez-Erache, M., López, C.H. y Perdomo, A.C., 2002. Distribution patterns of nutrients and symptoms of eutrophication in the Rio de la Plata River Estuary System. En: Orive, E., Elliott, M. y De Jonge, V.N., eds. *Nutrients and eutrophication in estuaries and coastal waters: Proceedings of the 31st Symposium of the Estuarine and Coastal Sciences Association (ECSA)*, held in Bilbao, Spain, 3–7 July 2000. Dordrecht: Springer.  
[https://doi.org/10.1007/978-94-017-2464-7\\_10](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2464-7_10)
- O'Farrell, I., Motta, C., Forastier, M., Polla, W., Otaño, S., Meichtry, N., Devercelli, M. y Lombardo, R. 2019. Ecological meta-analysis of bloom-forming planktonic Cyanobacteria in Argentina. En: *Harmful Algae*, 83, pp.1-13.  
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.01.004>
- Ockenden, M.C., Hollaway, M.J., Beven, K.J., Collins, A.L., Evans, R., Falloon, P.D., Forber, K. J., Hiscock, K.M., Kahana, R., Macleod, C.J.A., Tych, W., Villamizar, M.L., Wearing, C., Withers, P.J.A., Zhou, J.G., Barker, P.A., Burke, S., Freer, J.E., Johnes, P.J., Snell, M. A., Surridge, B.W.J. y Haygarth, P.M. 2017. Major agricultural changes required to mitigate phosphorus losses under climate change. En: *Nature Communications*, 8, pp.161.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-00232-0>
- Olano, H., Martigani, F., Somma, A. y Aubriot, L., 2019. Wastewater discharge with phytoplankton may favor cyanobacterial development in the main drinking water supply river in Uruguay. En: *Environmental Monitoring and Assessment*, 191(3), pp.146. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7288-4>
- Olesen, J.E. y Bindi, M., 2002. Consequences of climate change for European agricultural productivity, land use and policy. En: *European Journal of Agronomy*, 16, pp.239-262. [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(02\)00004-7](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(02)00004-7)
- Özen, A., Karapınar, B., Kucuk, İ., Jeppesen, E. y Beklioglu, M., 2010. Drought-induced changes in nutrient concentrations and retention in two shallow Mediterranean lakes subjected to different degrees of management. En: *Hydrobiologia*, 646, pp.61-72. <https://doi.org/10.1007/s10750-010-0179-x>
- Paerl, H. y Huisman, J., 2008. Blooms like it hot. En: *Science*, 320, pp.57-58.  
<https://doi.org/10.1126/science.1155398>

- Paerl, H.W., Scott, J.T., McCarthy, M.J., Newell, S.E., Gardner, W.S., Havens, K.E., Hoffman, D. K., Wilhelm, S.W. y Wurtsbaugh, W.A., 2016. It Takes Two to Tango: When and Where Dual Nutrient (N & P) Reductions Are Needed to Protect Lakes and Downstream Ecosystems. En: *Environmental Science & Technology*, 50, pp.10805-10813.  
<https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02575>
- Pahl-Wostl, C., 2015. *Water governance. Concepts, methods, and practice*. Cham: Springer
- Penn, C.J., Mcgrath, J.M., Rounds, E., Fox, G. y Heeren, D., 2012. Trapping phosphorus in runoff with a phosphorus removal structure. En: *Journal of Environmental Quality*, 41, pp.672-679.  
<https://doi.org/10.2134/jeq2011.0045>
- Perdomo, CH., Barreto, P. y Piñeiro, V., 2015. Pérdida de fósforo desde suelos agrícolas hacia aguas superficiales: resultados preliminares para Uruguay y posibles medidas de manejo para mitigar riesgos. En: Facultad de Agronomía. *IV Simposio Nacional de Agricultura*. Paysandú, Uruguay (28-29 de octubre de 2015). Paysandú: Facultad de Agronomía. pp.77-94.
- Peterson, H.M., Baker, L.A., Bruening, D., Nieber, J.L., Ulrich, J.S. y Wilson, B.N., 2017. Agricultural phosphorus balance calculator: a tool for watershed planning. En: *Journal of Soil and Water Conservation*, 72, pp.395-404.  
<https://doi.org/10.2489/jswc.72.4.395>
- Piccini, C., Aubriot, L., Fabre, A., Amaral, V., González-Piana, M., Giani, A., Figueredo, C.C., Vidal, L., Kruk, C. y Bonilla, S., 2011. Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. En: *Harmful Algae*, 10, pp.644-653. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.04.016>
- Pintos, W., Sommaruga, R., Alfonso, O., Leon, R.D. y Conde, D., 1986. *Reporte limnológico: estado de la eutrofización del Lago Jardín (Canelones, Uruguay)*. Montevideo: Facultad de Ciencias, Secc. Limnología.
- Poste, A.E., Hecky, R.E. y Guildford, S.J., 2011. Evaluating microcystin exposure risk through fish consumption. En: *Environmental Science & Technology*, 45, pp.5806-5811. <https://doi.org/10.1021/es200285c>

- Powers, S.M., Bruulsema, T.W., Burt, T.P., Chan, N.I., Elser, J.J., Haygarth, P.M., Howden, N.J.K., Jarvie, H.P., Lyu, Y., Peterson, H.M., Sharpley, Andrew, N., Shen, J., Worrall, F. y Zhang, F., 2016. Long-term accumulation and transport of anthropogenic phosphorus in three river basins. En: *Nature Geoscience*, 9, pp.353. <https://doi.org/10.1038/ngeo2693>
- Preece, E.P., Hardy, F.J., Moore, B.C. y Bryan, M., 2017. A review of microcystin detections in Estuarine and Marine waters: Environmental implications and human health risk. En: *Harmful Algae*, 61, pp.31-45. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.11.006>
- Quinton, J.N., Govers, G., Van Oost, K. y Bardgett, R.D., 2010. The impact of agricultural soil erosion on biogeochemical cycling. En: *Nature Geoscience*, 3, pp.311-314. <https://doi.org/10.1038/ngeo838>
- Quirós, R., Boveri, M.B., Petracchi, C.A., Rennella, A.M., Rosso, J.J., Sosnovsky, A. y Vonbernard, H.T., 2005. Los efectos de la agriculturización del humedal pampeano sobre la eutrofización de sus lagunas. En: Tundisi, G., Matsumura-Tundisi, T. y Galli, C. S., eds. *Eutrofização na América do Sul: Causas, conseqüências e tecnologias de gerenciamento e controle*. Rio de Janeiro: Instituto Internacional de Ecologia, Instituto Internacional de Ecologia e Gerenciamento Ambiental, Academia Brasileira de Ciências, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. pp.1-16.
- Reid, K., Schneider, K. y Joosse, P., 2019. Addressing imbalances in phosphorus accumulation in canadian agricultural soils. En: *Journal of Environmental Quality*, 48, pp.1156-1166. <https://doi.org/10.2134/jeq2019.05.0205>
- Ruane, E.M., Treacy, M., Mcnamara, K. y Humphreys, J., 2014. Farm-gate phosphorus balances and soil phosphorus concentrations on intensive dairy farms in the south-west of Ireland. En: *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 53, pp.105-119.
- Scasso, F., Mazzeo, N., Gorga, J., Kruk, C., Lacerot, G., Clemente, J., Fabian, D. y Bonilla, S., 2001. Limnological changes in a sub-tropical shallow hypertrophic lake during its restoration: two years of a whole-lake experiment. En: *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 11, pp.31-44. <https://doi.org/10.1002/aqc.420>

- Schärer, M., Stamm, C., Vollmer, T., Frossard, E., Oberson, A., Flühler, H. y Sinaj, S., 2007. Reducing phosphorus losses from over-fertilized grassland soils proves difficult in the short term. En: *Soil Use and Management*, 23, pp154-164. <https://doi.org/10.1111/j.1475-2743.2007.00114.x>
- Schindler, D., 2006. Recent advances in the understanding and management of eutrophication. En: *Limnology and Oceanography*, 51, pp.356-363. [https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.1\\_part\\_2.0356](https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.1_part_2.0356)
- Schindler, D.W., Carpenter, S.R., Chapra, S.C., Hecky, R.E. y Orihel, D.M. 2016. Reducing phosphorus to curb Lake Eutrophication is a success. En: *Environmental Science & Technology*, 50, pp.8923-8929. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02204>
- Sharpley, A.N., Bergström, L., Aronsson, H., Bechmann, M., Bolster, C.H., Börling, K., Djodjic, F., Jarvie, H.P., Schoumans, O.F., Stamm, C., Tonderski, K.S., Ulén, B., Uusitalo, R. y Withers, P.J.A., 2015. Future agriculture with minimized phosphorus losses to waters: Research needs and direction. En: *Ambio*, 44, pp.163-179. <https://doi.org/10.1007/s13280-014-0612-x>
- Sharpley, A.N., Mcdowell, R.W. y Kleinman, P.J.A., 2001. Phosphorus loss from land to water: integrating agricultural and environmental management. En: *Plant and Soil*, 237, pp.287-307. <https://doi.org/10.1023/A:1013335814593>
- Sims, J.T., Simard, R.R. y Joern, B.C., 1998. Phosphorus loss in agricultural drainage: historical perspective and current research. En: *Journal of Environmental Quality*, 27, pp.277-293. <https://doi.org/10.2134/jeq1998.00472425002700020006x>
- Smith, D.R., Huang, C. y Haney, R.L., 2017. Phosphorus fertilization, soil stratification, and potential water quality impacts. En: *Journal of Soil and Water Conservation*, 72, pp.417-424. <https://doi.org/10.2489/jswc.72.5.417>
- Smith, D.R., King, K.W. y Williams, M.R., 2015. What is causing the harmful algal blooms in Lake Erie? En: *Journal of Soil and Water Conservation*, 70, pp.27A-29A. <https://doi.org/10.2489/jswc.70.2.27A>
- Smith, V.H., Joye, S.B. y Howarth, R.W., 2006. Eutrophication of freshwater and marine ecosystems. En: *Limnology and Oceanography*, 51, pp.351-355. [https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.1\\_part\\_2.0351](https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.1_part_2.0351)

- Sommaruga, R., Conde, D. y Casal, J.A., 1995. The role of fertilizers and detergents for eutrophication in Uruguay. En: *Fresenius Environmental Bulletin*, 4, pp.111-116.
- Søndergaard, M., Jensen, J.P. y Jeppesen, E., 2003. Role of sediment and internal loading of phosphorus in shallow lakes. En: *Hydrobiologia*, 506, pp.135-145. <https://doi.org/10.1023/B:HYDR.0000008611.12704.dd>
- Steffen, M. e Inda, H., eds., 2010. *Bases técnicas para el manejo integrado de Laguna del Sauce y cuenca asociada*. Montevideo: Universidad de la República, South American Institute for Resilience and Sustainability Studies. 150 pp.
- Stutter, M.I., Chardon, W.J. y Kronvang, B., 2012. Riparian buffer strips as a multifunctional management tool in agricultural landscapes: introduction. En: *Journal of Environmental Quality*, 41, pp.297-303. <https://doi.org/10.2134/jeq2011.0439>
- Taranu, Z.E., Gregory-Eaves, I., Leavitt, P.R., Bunting, L., Buchaca, T., Catalan, J., Domaizon, I., Guilizzoni, P., Lami, A., McGowan, S., Moorhouse, H., Morabito, G., Pick, F.R., Stevenson, M.A., Thompson, P.L. y Vinebrooke, R.D., 2015. Acceleration of cyanobacterial dominance in north temperate-subarctic lakes during the Anthropocene. En: *Ecology Letters*, 18, pp.375-384. <https://doi.org/10.1111/ele.12420>
- Teixeira De Mello, F., Meerhoff, M., Pekcan-Hekim, Z. y Jeppesen, E., 2009. Substantial differences in littoral fish community structure and dynamics in subtropical and temperate shallow lakes. En: *Freshwater Biology*, 54, pp.1202-1215. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2009.02167.x>
- Testai, E., Scardala, S., Vichi, S., Buratti, F.M. y Funari, E., 2016. Risk to human health associated with the environmental occurrence of cyanobacterial neurotoxic alkaloids anatoxins and saxitoxins. En: *Critical Reviews in Toxicology*, 46, pp.385-419. <https://doi.org/10.3109/10408444.2015.1137865>
- Trimble, M., Jacobi, P., Olivier, T., Pascual, M., Zurbriggen, C., Garrido, L. y Mazzeo, N., 2020. Reconfiguring water governance for resilient social-ecological systems in South America. En: Baird, J. y Plummer, R., eds. *Water resilience*. Cham: Springer Nature. pp. 113-135.

- Trimble, M. y Mazzeo, N., 2020. Water governance for adaptation and resilience in the Anthropocene. En: Torres, P., Jacobi, P.R., Barbi, J. y Goncalves, L., eds. *Adaptation and public policies at the Sao Paulo macrometropolis: a science-policy approach*. São Paulo: Letra Capital Editora. pp. 29-33.
- Unión Europea. Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y el Consejo de 23 de octubre de 2000 por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. *Diario Oficial de la Comunidad Europea*, 22 de diciembre de 2000, L 327, pp.72.
- Uruguay. Decreto 253/979, de 9 de mayo de 1979. *Diario Oficial*, 31 de mayo de 1979, p.1479.
- Uruguay. Decreto 284/990, de 21 de junio de 1990. *Diario Oficial*, 25 de julio de 1990, p.649.
- Uruguay. Decreto 333/004, de 16 de setiembre de 2004. *Diario Oficial*, 22 de setiembre de 2004, p.671.
- Uruguay. Decreto 405/008, de 21 de agosto de 2008. *Diario Oficial*, 27 de agosto de 2008, p.645.
- Uruguay. Ley 15.239, de 23 de diciembre de 1981. *Diario Oficial*, 07 de enero de 1982, p.1976.
- Uruguay. Ley 19.553, de 27 de octubre de 2017. *Diario Oficial*, 16 de noviembre de 2017, p. 5.
- Uruguay. Ministerio de Ganadería Agricultura y pesca, DIEA, 2019. *Anuario estadístico agropecuario*. Montevideo: MGAP.
- Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, DINAMA, 2020. *Indicadores ambientales: agua, concentración de fósforo total* [En línea]. Montevideo: DINAMA. [Consulta: 30 de abril de 2020]. Disponible en:  
[https://www.dinama.gub.uy/indicadores\\_ambientales/ficha/oan-concentracion-de-fosforo-total/](https://www.dinama.gub.uy/indicadores_ambientales/ficha/oan-concentracion-de-fosforo-total/)
- Vidal, F., Sedan, D., D'agostino, D., Cavalieri, M.L., Mullen, E., Parot Varela, M.M., Flores, C., Caixach, J. y Andrinolo, D., 2017. Recreational exposure during algal bloom in carrasco beach, Uruguay: A Liver Failure Case Report. En: *Toxins*, 9, pp.267. <https://doi.org/10.3390/toxins9090267>

- Vidal, L. y Britos, A., 2012. Uruguay: occurrence, toxicity and regulation of Cyanobacteria [En línea]. En: Chorus, I., ed. *Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries*. Dessau: Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt). [Consulta:30 de abril de 2020]. Disponible en: <https://www.umweltbundesamt.de/publikationen/current-approaches-to-cyanotoxin-risk-assessment-0>
- Vitousek, P.M., Cassman, K., Cleveland, C., Crews, T., Field, C.B., Grimm, N.B., Howarth, R. W., Marino, R., Martinelli, L., Rastetter, E.B. y Spret, J.I., 2002. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. En: Boyer, E.W. y Howarth, R.W., eds. *The nitrogen cycle at regional to global scales*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Whitton, B.A., 2012. *Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time*. Berlín: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3>



## **MCM Alchimia Methods: solved examples on computer-aided uncertainty quantification**

**Metodología de MCM Alchimia: ejemplos resueltos de estimación de incertidumbre asistida por computadora**

**Metodologia MCM Alchimia: exemplos resolvidos de quantificação de incerteza auxiliada por computador**

**Pablo Constantino**<sup>1</sup>, \* <https://orcid.org/0000-0001-6857-9432>

\*Contacto: [pconstan@latu.org.uy](mailto:pconstan@latu.org.uy)

<sup>1</sup>Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Uruguay

**Recepción:** 15 Julio 2020 **Aprobación:** 22 Abril 2021

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional.

**Abstract:** MCM Alchimia is a free and multilingual desktop application, which runs on Windows. It is available to download from the Internet. This application implements the processes indicated in the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM) and the Supplement 1 of this document, easily obtaining measurement results and associated expanded uncertainty, with a detailed uncertainty budget according to GUM, and a summary of statistical parameters of the simulated sample obtained by Monte Carlo Method (MCM). This work establishes an intuitive and rapid guide for estimating measurement uncertainties by GUM and MCM methods with the software MCM Alchimia, through discussion of five examples from document JCGM 100: 2008 and three from JCGM 101: 2008. Some features and algorithms of the software are explained in detail. Particularly, functions and tools that are not available in other similar software applications, for example, the estimation of uncertainties in test models that involve the use of least-square fittings. In addition, more intuitive approaches to some problem than those suggested in the JCGM guides are shown, discussing different features available in the software to perform an easy data treatment of complex measurement models.

**Keywords:** GUM, MCM, Monte Carlo, JCGM 100 examples.

**Resumen:** MCM Alchimia es una aplicación de escritorio multilingüe y gratuita para Windows, que está disponible para descargar de Internet. Esta aplicación implementa los procesos indicados en la Guía para la Expresión de la Incertidumbre de Medida (GUM) y el Suplemento 1 de este documento, obteniendo rápidamente resultados de medición e incertidumbre expandida asociada, con un detallado presupuesto de incertidumbre según GUM y un resumen de parámetros estadísticos de la muestra obtenida por simulación de Monte Carlo (MCM). Este trabajo establece una guía intuitiva y rápida para estimar las incertidumbres de medición, utilizando el software MCM Alchimia, a través del análisis de la solución por GUM y MCM de cinco ejemplos del documento JCGM 100: 2008 y tres de JCGM 101: 2008. Se explican pormenorizadamente algunos aspectos y algoritmos del software, deteniéndose en funciones y herramientas que no se encuentran en otras aplicaciones de software similares, por ejemplo, la estimación de incertidumbres en modelos de ensayo que implican el uso de curvas obtenidas por ajuste de mínimos cuadrados. Además, se muestran enfoques más intuitivos para la solución usando MCM Alchimia que los sugeridos en las guías JCGM, discutiendo diferentes características disponibles en el software que permiten realizar un tratamiento de datos rápido de modelos matemáticos complejos.

**Palabras clave:** GUM, MCM, Monte Carlo, ejemplos JCGM 100.

**Resumo:** MCM Alchimia é um software de desktop multilíngue gratuito que roda em Windows. Ele está disponível para baixar da Internet. Esta aplicação implementa os processos indicados na Guia para a Expressão de Incerteza na Medição (GUM) e no Suplemento 1 deste documento, obtendo facilmente resultados de medição e incerteza expandida associada, com um quadro de incerteza detalhado de acordo com GUM, e um resumo estatístico de parâmetros da amostra simulada obtida pelo Método de Monte Carlo (MCM). Este trabalho estabelece um guia intuitivo e rápido para estimar incertezas de medição pelos métodos GUM e MCM com o software MCM Alchimia, por meio da discussão de cinco exemplos do documento JCGM 100: 2008 e três do JCGM 101: 2008. Alguns recursos e algoritmos do software são explicado em detalhes. Particularmente, funções e ferramentas que não estão disponíveis em outros aplicativos de software semelhantes, por exemplo, a estimativa de incertezas em modelos de teste que envolvem o uso de ajustes mínimos quadrados. Além disso,

são mostradas para algum problema abordagens mais intuitivas do que as sugeridas nos guias JCGM, discutindo os diferentes recursos disponíveis no software para realizar um tratamento de dados fácil de modelos de medição complexos.

**Palavras-chave:** GUM, MCM, Monte Carlo, JCGM 100 exemplos.

## INTRODUCTION

MCM Alchimia (Alchimia Project, s.d.) is a desktop application that automates the process of evaluating the uncertainty associated to the results of an output quantity or measurand which can be obtained directly from the combination of an unlimited number of input quantities, whose value, uncertainty and probability distribution functions (hereinafter PDF) are known. The software estimates the measurement uncertainty according to the general directives established in the guide JCGM 100:2008 (BIPM, et al., 2008a), as well as through the Monte Carlo method, established in supplement 1 of this same guide: JCGM 101:2008 (BIPM, et al., 2008b). Input quantities can be correlated or not, or even be the result of an interpolation from a calibration curve. The first approach (hereinafter GUM, an acronym for the words Guide of Uncertainty of Measurement that the aforementioned document references), establishes an approximate estimation method represented by the Uncertainty Propagation Law, an equation based on the development of the measurand function in first order Taylor series. The Monte Carlo approach (hereinafter MCM, acronym for Monte Carlo Method) is based on the propagation of distributions from a random sampling in probability distribution functions. This work does not delve into the general aspects of these methods or their differences, but rather it offers a simple software alternative that implements both methods to solve specific situations.

**Motivation and milestones in development.** MCM Alchimia (Alchimia Project, s.d.) was developed in 2012 in an attempt to provide metrologists, laboratory analysts and researchers with a simple tool for estimating uncertainties by the Monte Carlo method. Most of the software tools that performed the estimation of uncertainties available at the time, did so by means of the law of propagation of uncertainties or GUM. Alternatively, existing applications that performed Monte Carlo simulations were rather either focused on the generality of the method or problem resolution in mathematics and economics. Technicians who carry out measurements handle more information than the characteristics of the sample resulting from the simulation, for example the contribution of uncertainty of the input quantities. The essential computer aspects and minimum statistical requirements for a software application that performs the estimation of uncertainties by MCM were studied, in order to ensure that the estimation of uncertainty, even in complex mathematical models, yields results that are valid according to the ISO GUM (Constantino, 2013). Based on these studies, the first version of the application is created, and one year after, a second version is released containing improvements to the interface and to simulation algorithms.

In 2016, aiming particular needs in chemical measurements, a specific module was developed to perform Monte Carlo simulations in measurement models that included interpolation values in an external calibration curve as input quantities. In its final version, this module is able to obtain adjustment curves for ordinary, inverse and total least squares, in the latter case, by means of the method called Primary Component Analysis (PCA). The input data for the curve can be constant or have uncertainties. Uncertainties can be assigned to both the independent and dependent variable values. The uncertainty for these input quantities is individual for each pair of data, and can be assigned Gaussian, rectangular, or triangular probability distribution functions, as well as constants, that is, without uncertainty. From this curve, interpolated magnitudes on both axis can be included in the test model or, otherwise, directly use regression parameters slope, intercept or even the standard error of the regression as a component of uncertainty. This module was included in version 3 of MCM Alchimia (Alchimia Project, s.d.), and is, to this day, the only free software application that performs uncertainty analysis on calibration curves by the Monte Carlo method. The operation of the regression module is detailed in Example 2 of this document.

In 2018, version 4 was launched, adding an estimation module to perform calculations according to the classic GUM framework. This module yield an uncertainty budget table with estimated variances of each particular contribution, degrees of freedom, effective degrees of freedom product of the Welch-Satterwhite formulae, and the correct expression of measurement and associated uncertainty, according to ISO GUM JCGM 100:2008 (BIPM, et al., 2008a). Finally, in the year 2020 a new revision, version 5 of this software is carried out, adding advanced specifications of reliability and degrees of freedom for the input parameters with contributions of type B uncertainty, and regression analysis by GUM framework as the main improvements.

In the following sections, the particularities of the application and the calculation methods used are studied in detail, subjecting these aspects to the resolution of the examples documented in the reference standards.

## METHODS

To establish a working method with the MCM Alchimia software (Alchimia Project, s.d.), most of the examples contained in GUM and its supplement 1 are thoroughly studied, proposing the use of different calculation strategies, if they exist, or even some features of the software that facilitates the work of quantifying uncertainty. In addition, the differences found between the results obtained by GUM and MCM are discussed. Although the application is very intuitive and contains almost no configuration menus, the calculation approach that best represents the case under study is not always obvious. The examples detailed below are not fully developed, as they appear in the reference document, only the computer-aided solution using MCM Alchimia is discussed (Alchimia Project, s.d.), as well as the aspects and features of the application that will improve or simplify obtaining results. The main aspect to study in each example will be described under its title.

The objective that is sought with this technical note is to provide a method as easy as possible so that the examples can be resolved with the chosen software and as it is set out in the reference documents. For this, the units in tables and calculations were kept exactly as indicated in the original documents, warning the reader that not all examples are raised and resolved in international system units (SI).

On the other hand, regarding the chosen software, it is possible that some terms are not consistent with the VIM (International Vocabulary of Metrology) – JCGM 200:2012 (BIPM, et al., 2012). In particular, it is relevant to warn that the term Confidence Interval should be understood as Coverage Interval.

**Example 1. Calibration of end gauge blocks (from: JCGM 100:2008, H1)**  
**Topic: Calculation strategy and workflow**

The measurement objective is to obtain the calibration error with respect to the nominal value. This error is obtained by mechanical comparison, with a comparator equipment, from the difference in length between the block under test and a calibrated standard block. The mathematical model used for this test according to the reference document, and which can be typed directly in the equation field of the step 2 of the application would be:

$$l = l_s + d - l_s(\delta\alpha.\theta + \alpha_s.\delta\theta) \quad \text{Eq. 1 (in JCGM 100:2008 - Eq H.3)}$$

Where  $l$  is the length at 20 °C of sample gauge block,  $l_s$  the length of standard block at 20 °C from its calibration certificate,  $\delta\theta$  y  $\delta\alpha$  correspond respectively to the difference between test temperatures and between the coefficients of thermal expansion for the standard block and the block under test.  $\alpha_s$  is the coefficient of thermal expansion of the standard block, while  $\theta$  represents the temperature deviation of the standard block. It should be noted in the statement that some magnitudes of the model include more than one source of uncertainty. For example, the difference between the blocks ( $d$ ), whose value is the mean of the observations, presents an uncertainty component due to repeatability ( $d_{rep}$ ). Adding to that, in this example, is assigned a historical value (pooled standard deviation), another due to random effects of the comparator ( $d_{rnd}$ ) and a third due to the systematic effects of the comparator ( $d_{sist}$ ). In the same way,  $\theta$  includes uncertainties components for the average temperature of the calibration bench ( $\theta_{tb}$ ) and by the cyclical variation of the laboratory temperature ( $\theta_{cyc}$ ).

It is common for all test models to have quantities with more than one source of uncertainty. The recommended proceeding when implementing these models in MCM Alchimia (Alchimia Project, s.d.), is to split these magnitudes previously into a constant with their value and add their uncertainty components with value equals zero. In this and the following examples, it will be done in this way. Therefore, equation 1 split down into sources of uncertainty will be:

$$l = ls + (d_{val} + d_{rep} + d_{rnd} + d_{sist}) - ls (\delta\alpha \cdot (\theta_{val} + \theta_{tb} + \theta_{cyc}) + \alpha_s \cdot \delta\theta) \quad \text{Eq. 2}$$

$u(x_i)$  and degrees of freedom for  $d_{sist}$ ,  $\delta\alpha$  y  $\delta\theta$  are affected by the concept of reliability, according to what is stated in the document. As usual for a standard uncertainty obtained from a Type B evaluation, most available software assigns infinite degrees of freedom. However, the JCGM 100 (BIPM, et al., 2008a) guide establishes an equation to calculate this value.

$$\nu_i \approx \frac{1}{2} \left[ \frac{\Delta u(x_i)}{u(x_i)} \right]^{-2} \quad \text{Eq. 3}$$

Equation 3, G.3 in JCGM 100:2008 (BIPM, et al., 2008a) defines degrees of freedom ( $\nu_i$ ) for the type B evaluation of a standard uncertainty with a reliability based on available information. The 5th version of MCM Alchimia (Alchimia Project, s.d.) implements this equation and, therefore, the possibility of working with reliability values in the most common PDF, Gaussian (Normal) and Rectangular functions. In these cases, these distributions can be used in the same way as in previous versions, with infinite degrees of freedom, or a finite number of degrees of freedom which can be indicated in advanced setting panel. Although the concept of reliability and degrees of freedom can be independently selected, both are used for calculation purposes, it is not possible to rule out one of them. That is, when indicating a value of reliability, the degrees of freedom will be established and vice versa. It is important to clarify that the concept of reliability handled in the software is the intuitive one in the spoken language as indicated by Eq. 4 and 5, and not the one used by JCGM 100 (BIPM, et al., 2008a), which is the opposite. For example, in this case, if we talk about a relative uncertainty of 25%, we mean a reliability of 75% and it will have to be indicated so in the established field.

$$\nu_i \approx \frac{1}{2} \left[ 1 - \frac{R_i}{100} \right]^{-2} \quad \text{Eq. 4 (Santana, et al., 2019)}$$

$$R_i \approx 100 \cdot \left[ 1 - \sqrt{\frac{1}{2\nu_i}} \right] \quad \text{Eq. 5}$$

Where  $R_i$  represents the relative reliability, as established in MCM Alchimia 5 (Alchimia Project, s.d.). Following Table 1 shows PDF data and calculation that have to be typed in PDF panels of the application.

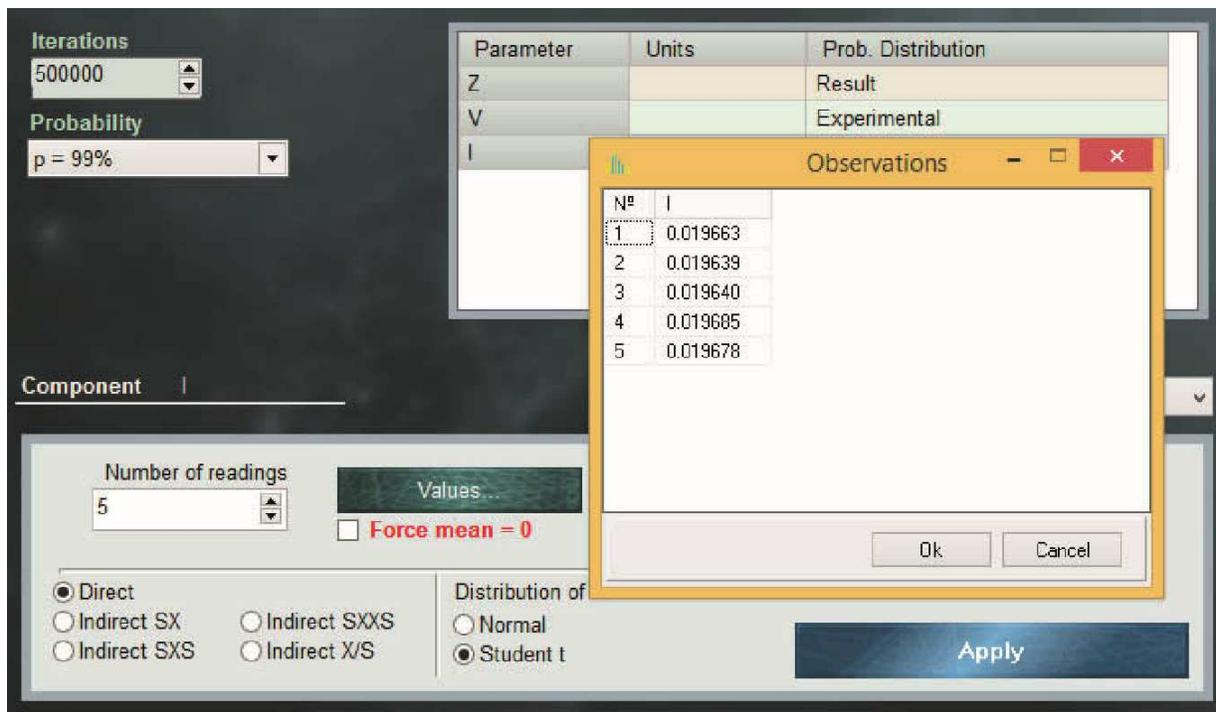
**Table 1.** Simulation data of example 1. (1) By selecting “Use calibration certificate”, MCM Alchimia allows to configure a Normal probability distribution, using the expanded uncertainty  $U$  and the coverage factor  $k$  of a calibration certificate, which is usually better in these cases. The standard deviation indicated in Table 1 is the value resulting from the  $U/k$  operation, which the software performs automatically. (2) The values in bold font are taken from the example statement. The software automatically calculates the corresponding reliability or degrees of freedom.

| Quantity (Qty) | Unit             | Probability distribution function (PDF) | Value, Mean or Expectation (Val) | Standard deviation or semi-width interval (dev/hi) | Special PDF properties |                         |                           |                           |
|----------------|------------------|---|----------------------------------|--|------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                |                  |   |                                  |  | % Reliability (Rlty)   | Degrees of freedom (Df) | Pooled standard deviation | Pooled degrees of freedom |
| $l_s$          | mm               | Normal                                  | 50,000623                        | 2.50E-5 (1)  | 83                     | 18                      |                           |                           |
| $d_{val}$      | mm               | Constant                                | 215E-6                           |  |                        |                         |                           |                           |
| $d_{rep}$      | mm               | Normal                                  | 0                                |  | 65                     | <b>4</b> (2)            | 13E-6                     | 24                        |
| $d_{rnd}$      | mm               | Normal                                  | 0                                | 0.00389 (1)  | 68                     | <b>5</b> (2)            |                           |                           |
| $d_{sist}$     | mm               | Normal                                  | 0                                | 0.02E-3 (1)  | <b>75</b> (2)          | 8                       |                           |                           |
| $\delta\alpha$ | °C <sup>-1</sup> | Rectangular                             | 0                                | 1E-6   | <b>90</b> (2)          | 10                      |                           |                           |
| $\theta_{val}$ | °C               | Constant                                | 0,10                             |  |                        |                         |                           |                           |
| $\theta_{tb}$  | °C               | Normal                                  | 0                                | 0.2  |                        |                         |                           |                           |
| $\theta_{cyc}$ | °C               | U Shaped                                | 0                                | 0.5  |                        |                         |                           |                           |
| $\alpha S$     | °C <sup>-1</sup> | Rectangular                             | 11.5E-6                          | 2E-6   |                        |                         |                           |                           |
| $\delta\theta$ | °C               | Rectangular                             | 0                                | 0.05   | 50 %                   | 2                       |                           |                           |

**Example 2. Resistance measurement (from: JCGM 100:2008, H2)**  
**Topic: Input of experimental data and use of correlation matrix**

This example only considers the evaluation of type A standard uncertainties, based on input variables representing series of observations. In a real case, the existence of systematic effects must also be considered, which are not taken into account in this example. The measurement problem refers to the calculation of the resistance  $R$  and the reactance  $X$ , from readings of the potential difference between the terminals  $V$ , the alternating current  $I$  passing through it, and the phase-shift angle between the potential difference and the alternating current. This technical note will only address the measuring of  $R$ , since the uncertainty of  $X$  and  $Z$  can be estimated in the same way.

Directly applying the recommendations of the guide, the experimental data must be input into the mathematical model as variables with t student probability distribution and with degrees of freedom indicated in the example approach. When using a t distribution, it is mandatory to calculate previously the mean and standard deviation of the means as PDF parameters. However, MCM Alchimia (Alchimia Project, s.d.) includes an item called "Experimental" near bottom of the list of probability distributions. This feature allows the technician to input the raw experimental data, from which the application calculates the arithmetic mean, degrees of freedom calculated as  $n-1$  and the standard deviation of the means as  $\frac{s}{\sqrt{n}}$ , where  $s$  is the standard deviation of the sample and  $n$  the number of observations. Thus, the random sampling distribution for such a quantity should be student t with means, standard deviation, and degrees of freedom calculated automatically.



**Figure 1.** Window for experimental data variables (Experimental PDF).

According to what the example establishes, the input quantities are correlated. The correlations between two random variables (eg  $x_1$  and  $x_2$ ) can be calculated previously by determining the covariance from equation 6:

$$s(\bar{x}_1, \bar{x}_2) = \frac{1}{n(n-1)} \sum (x_1 - \bar{x}_1)(x_2 - \bar{x}_2) \quad \text{Eq. 6}$$

And using the resulting value to determine the correlation coefficient  $r(x_1, x_2)$ , according to equation 7:

$$r(x_1, x_2) = \frac{s(\bar{x}_1, \bar{x}_2)}{s(\bar{x}_1)s(\bar{x}_2)} \quad \text{Eq. 7}$$

In equations 6 y 7,  $s(\bar{x}_1, \bar{x}_2)$  represents the covariance of arithmetic means of variables  $x_1$ , and  $x_2$ , while  $\bar{x}_1$ ,  $\bar{x}_2$ ,  $s(\bar{x}_1)$  and  $s(\bar{x}_2)$  correspond to the arithmetic means of  $x_1$  and  $x_2$  and their respective standard deviations.

MCM Alchimia (Alchimia Project, s.d.) supports the use of correlated magnitudes in the models, through the window that opens with step 4 button. In this section a correlations matrix is available, with a number of rows and columns equivalent to the magnitudes of which the measurand is function. This matrix is automatically rebuild every time the mathematical model of the trial is modified with a number of rows and columns equal to the number of variables involved in the model. For the estimation of the standard uncertainty of  $R$  by the GUM method with correlated input variables, the software calculates numerically, the sensitivity coefficients  $c_i$ , estimating the standard uncertainty as:

$$u_R^2 = c_V^2 u_V^2 + c_I^2 u_I^2 + c_\theta^2 u_\theta^2 + 2(c_V c_I u_V u_I r_{V,I} + c_V c_\theta u_V u_\theta r_{V,\theta} + c_I c_\theta u_I u_\theta r_{I,\theta}) \quad \text{Eq. 8}$$

Where  $u_R$  is the standard uncertainty of measurand  $R$ ,  $c_V$ ,  $c_I$  and  $c_\theta$  are the sensitivity coefficients of the potential difference, current and phase-shift angle respectively, whereas  $u_V$ ,  $u_I$  and  $u_\theta$  their respective standard uncertainties. Finally,  $r(i,j)$  is the estimated correlation coefficient between the component  $i$  and the component  $j$ , obtained from equation 9:

$$r_{i,j} = \frac{u_{i,j}}{u_i u_j} \quad \text{Eq. 9}$$

Where  $u_{ij}$  is the estimated covariance, associated to  $V$  and  $I$ .

An interesting approach, not addressed in the JCGM guide, arises when we try to calculate the expanded uncertainty from the standard uncertainty of equation 8 and its effective degrees of freedom. The reference guide indicates that the effective degrees of freedom must be calculated using the Welch-Satterthwite formula.

$$\nu_{\text{eff}} = \frac{u_y^4}{\sum_{i=1}^n \frac{u_i^4}{\nu_i}} \quad \text{Eq. 10}$$

However, an important factor to take into account when calculating the effective degrees of freedom for the modification of the expanded uncertainty, is that the Welch-Satterthwite equation is only valid for models that have independent (uncorrelated) uncertainty components with finite degrees of freedom. Consequently, in this example, the effective degrees of freedom must be calculated by means of an adequate generalization of Welch-Satterthwite formula, to be valid in mathematical models with non-independent error components (Willink, 2007). MCM Alchimia 5 (Alchimia Project, s.d.), implements the generalization of the Welch-Satterthwite formula defined by equation 11 (Castrup, 2010).

$$v_{\text{eff}} = \frac{(u_y^4)}{\sum_{i=1}^n \frac{c_i^4 u_i^4}{v_i} + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j>i}^n \rho_{ij}^2 c_i^2 c_j^2 \left(\frac{u_i^2}{v_i}\right) \left(\frac{u_j^2}{v_j}\right) \left(v_i + v_j + \frac{1}{2}\right) + 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j>i}^n \rho_{ij} c_i c_j u_i u_j \left(\frac{c_i^2 u_i^2}{v_i} + \frac{c_j^2 u_j^2}{v_j}\right)} \quad \text{Eq. 11}$$

For data processing by the Monte Carlo method, MCM Alchimia (Alchimia Project, s.d.) also supports correlated input quantities. In this case the software carries out the correlation calculations by re-simulating random samples for  $V$  and  $I$  through a conversion of the correlation matrix indicated in the panel of step 4 into a covariance matrix and then decomposing the latter by means of a Cholesky factorization to obtain a lower triangular matrix. The product of this triangular matrix and the matrix with the uncorrelated input samples is then used to obtain samples with the indicated correlations for the input quantities of the model. The software implements all these operations automatically, so nothing is required to be done, beyond typing the corresponding coefficients in the correlation matrix.

### Example 3. Calibration of a thermometer (from: JCGM 100:2008, H3)

#### Topic: Least squares fitting and calibration curves

One of the main tools of MCM Alchimia is the regressions module (Alchimia Project, s.d.). This feature allows the user to perform the least squares analysis of a set of values and solve a mathematical model that contains an interpolated value from abscissa or ordinate, as an input variable. The software has two methods for data processing. The first method uses the slope and intercept parameters as input quantity. The second one uses a specific function to predict a value on one axis from a known value on the other.

Example H.3 of JCGM 100: 2008 (BIPM, et al., 2008a) establishes that both the abscissa and the ordinate in the standard curve are constant values, that is, that their contribution of uncertainty is zero, as well as the temperature of which we want to predict their correction. At this point it is important to note that in most cases of real data this is not true, rather at least the data of the y-axis, either axes or even both, present contributions of uncertainty that, depending on the case, can be significant. This example is solved with the data set out in the reference standard in order to compare results; nevertheless, it is relevant to remember that MCM Alchimia (Alchimia Project, s.d.) supports curves with uncertainties in both axes, one or none. In those cases where uncertainty values are indicated for the axes, the uncertainty contribution of the regression parameters due to stochastic effects are taken into account in the values resulting from the prediction in x-axis or y-axis.

The problem to be addressed is the calibration of a thermometer at 11 points in the range of 21°C to 27°C, comparing the thermometer readings ( $t_k$ ) for which negligible uncertainty is assumed, with the corresponding reference temperature of a calibrated standard ( $t_{R,k}$ ). Then, the corrections are obtained using a linear regression or the direct square limits method, obtaining slope and intercept parameters.

This example addresses the least squares fitting to obtain the curve and how these slope and intercept parameters, as well as their respective variances and covariances are used to obtain the standard uncertainty limited to the correction, predicted according to equation 12.

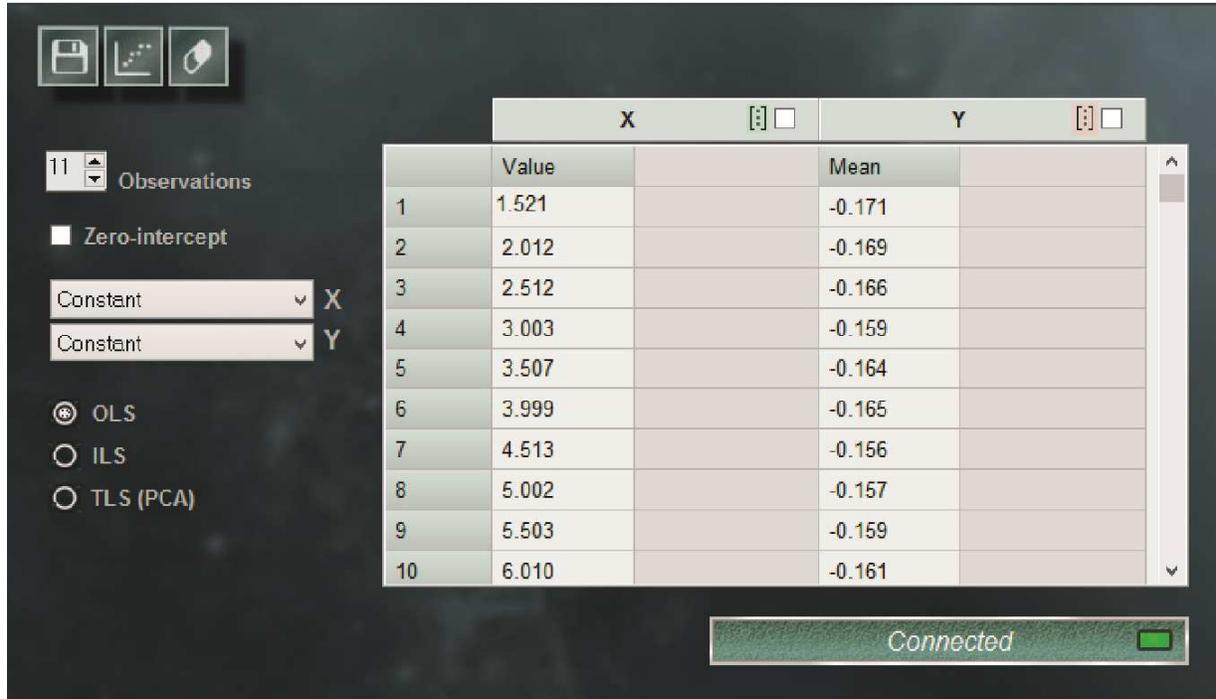
$$b(t) = y_1 + y_2 (t - t_0) \quad \text{Eq. 12}$$

The document shows least squares analysis for different abscissa data, varying the value taken for the reference temperature  $t_0$ . These regression parameters obtained present correlation coefficients of different magnitude according to the set of input values used (that is, for each value of  $t_0$ ). The correlation between the slope and the ordinate at the origin can even be null by taking:

$$t_0 = \bar{t} = \left( \sum_{k=1}^n t_k \right) / n \quad \text{Eq. 13}$$

Finally, with the calculated regression coefficients, the correction for  $t = 30 \text{ }^\circ\text{C}$  and its standard uncertainty are estimated, obtaining the same result regardless of the value of  $t_0$  used.

If we want to reproduce this calculation with MCM Alchimia (Alchimia Project, s.d.), in the same way that the document does, we can use the expression of equation 12 as the mathematical model of the test. Then, to assign probability distributions to the regression coefficients  $y_1$  and  $y_2$ . The software has available a tool in the list of PDF called Regression, where the corresponding curve parameter can be selected without entering any additional information. The software automatically performs the required numerical assignments for based on the data from the connected regression. Of course, the regression parameters are only available for models with a connected curve.



**Figure 2.** MCM Alchimia regression window (Alchimia Project, s.d.).

According to the text of the reference document, the slope and intercept are correlated. The correlation coefficient can be calculated with equation 14:

$$r(y_1, y_2) = -\frac{\sum \theta_k}{\sqrt{n \sum \theta_k^2}} \quad \text{Eq. 14}$$

Where  $r$ , is the correlation coefficient for the ordinate at the origin (intercept) ( $y_1$ ) and the slope ( $y_2$ ),  $n$  the number of observations,  $\theta_k = (t_k - t_0)$ , with  $t_0$  the reference temperature, in this case  $t_0 = 20$  °C according to what was stated. Eq. 11 it results in  $r(y_1, y_2) = -0.930$ . This value must be entered into the correlation matrix by clicking on the button of step 4 of the software.

**Example 4. Measurement of activity (from: JCGM 100:2008, H4)**  
**Topic: Repeatability**

This example consists in the determination of the Radon ( $^{222}\text{Rn}$ ) activity in a water sample by counting the liquid scintillation by comparison with a standard sample of radon in water of known activity. The determination is carried out by measuring the pattern of known activity, a sample of water without radioactive substance and the sample with unknown activity.

The presentation of the problem shows a table with six measurement cycles from each of the three counting sources, with a counting interval of  $T_0 = 60$  min. From this table, the count

corrected for background noise  $R_X$  and decay  $R_S$  are calculated, according to equations 15 and 16:

$$R_X = \left[ \frac{(C_X - C_B)}{T_0} \right] e^{\lambda t_x} \quad \text{Eq. 15}$$

$$R_S = \left[ \frac{(C_S - C_B)}{T_0} \right] e^{\lambda t_s} \quad \text{Eq. 16}$$

Obtaining a new table with the following results.

**Table 2.** Corrected count results for the 6 cycles. With a correlation coefficient between  $R_X$  and  $R_S$ :  $r(R_X, R_S) = 0.646$ .

| Cycle $k$ | $R_x$ (min-1) | $R_s$ (min-1) | $t_x - t_s$ (min) | $R = R_x / R_s$ |
|-----------|---------------|---------------|-------------------|-----------------|
| 1         | 652.46        | 194.65        | 123.63            | 3.3520          |
| 2         | 666.48        | 208.58        | 123.13            | 3.1953          |
| 3         | 665.80        | 211.08        | 123.12            | 3.1543          |
| 4         | 655.68        | 214.17        | 123.11            | 3.0615          |
| 5         | 651.87        | 213.92        | 123.12            | 3.0473          |
| 6         | 623.31        | 194.13        | 123.11            | 3.2107          |

Example 4 presents two ways to solve the problem. Both approaches can be reproduced with MCM Alchimia (Alchimia Project, s.d.). The first way is to use mean values of  $R_x$  and  $R_s$ , taking into account the correlation between these values. The equation to obtain the known activity  $A_x$  will be equation 17:

$$A_x = A_s \frac{m_s}{m_x} \frac{R_x}{R_s} \quad \text{Eq.17}$$

To solve it using MCM Alchimia (Alchimia Project, s.d.), it is better to assign experimental values to  $R_x$  and  $R_s$  instead of a Gaussian or t distribution. This method of using experimental values with the software is explained in Example 2.

Before running the simulation and GUM estimation, it is mandatory to enter the correlation coefficient in the correlation matrix and connect it to the model.

Example 4 of JCGM100: 2008 (BIPM, et al., 2008a), establishes also a second approach to the solution that dispenses with the use of correlated variables, by means of the ratio  $R = R_X / R_S$ , which can be calculated more simply by means of equation 18:

$$R = \left[ \frac{C_X - C_B}{C_S - C_B} \right] e^{\lambda(t_x - t_s)} \quad \text{Eq. 18}$$

And using the mean of the six values in the equation 19:

$$Ax = As \frac{m_s}{m_x} \bar{R} \quad \text{Eq. 19}$$

Applying these changes to the mathematical model and overriding the correlation, results identical to those of the other method are obtained.

**Example 5. Rockwell hardness measurement (from: JCGM 100:2008, H6)**  
**Topic: Standard deviation of the sample mean, without knowing the individual observations**

In this case, the example addresses the hardness measurement of a sample block of material, on the Rockwell "C" scale. For this purpose, a measuring machine previously calibrated with a standard machine is used.

The hardness test is carried out by pressing an indenter of specific dimensions, with a defined force, on the surface of the material under test. Hardness can be determined as the arithmetic mean of a given number of indenter penetration depth measurements. The unit of hardness on the Rockwell-C scale is 0.002 mm, with a hardness on that scale defined as  $100 \times (0.002 \text{ mm})$  minus the average depth measured in mm, of 5 penetrations.

The mathematical model for determining hardness involves not only the average depth of the prints made with the indenter of the calibration machine, but also the average depth of indentations made in the same block by the master machine. Thus, the mathematical model can be presented in mm, as:

$$H_{\text{Rockwell } C} = 100(0.002 \text{ mm}) - \bar{d}_{\text{mm}} - \Delta_{c,\text{mm}} - \Delta_{b,\text{mm}} - \Delta_{S,\text{mm}} \quad \text{Eq. 20}$$

Where  $\bar{d}$  is the average depth of five penetrations made with the calibration machine,  $\Delta_c$  is the correction obtained from a comparison between the calibration machine and the standard machine.  $\Delta_b$  is the difference in hardness between two areas of the transfer block surface tested by the two machines, and  $\Delta_s$  the uncertainty contribution of the pattern machine. The suffix mm in the variables indicates that they must be in this unit in this equation.

Since the data is given in units of the Rockwell scale we can rewrite the equation in these units:

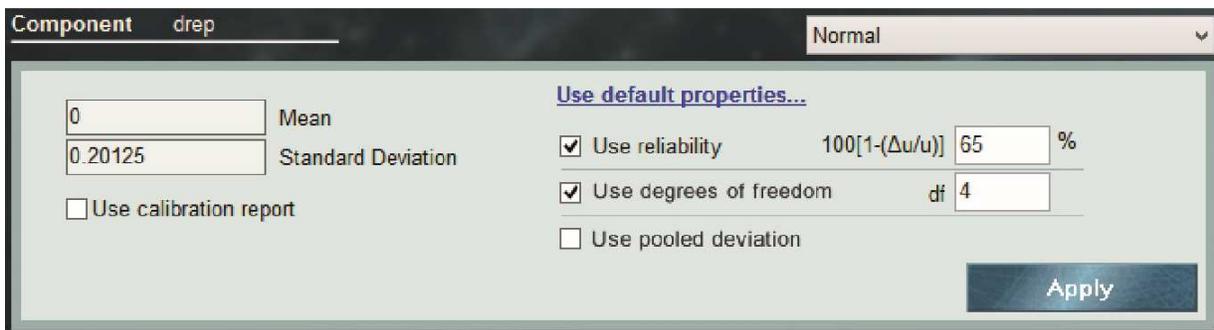
$$H_{\text{Rockwell } C} = 100 - \bar{d} - \Delta_c - \Delta_b - \Delta_s \quad \text{Eq. 21}$$

In equations 20 and 21, the quantity  $\bar{d}$  has two components of uncertainty, due to the repetition of observations and the other due to the indication or resolution of the equipment. As in example 1, the random variable is split into value and uncertainty components:

$$\bar{d} = d_{val} + d_{res} + d_{rep} \quad \text{Eq. 22}$$

Where  $d_{val}$  is the arithmetic mean of depth measurements,  $d_{res}$  the uncertainty contribution due to resolution and  $d_{rep}$  the repeatability component. In this equation  $d_{val}$ , it is a constant of value 36.0 Rockwell scale units.  $d_{rep}$  corresponds to a type A uncertainty component. The example statement indicates a sample standard deviation of 0.45 units, however, it is necessary to take into account that the variable  $d$  corresponds to an average of five values. Therefore, the uncertainty component must be the standard deviation of the sample means, that is, divide the given value of the sample standard deviation by the square root of the number of observations in the sample.

Thus,  $u_{(d_{rep})} = 0.45/\sqrt{5} = 0.20125$ . The distribution function to be assigned can be a t-distribution with 4 degrees of freedom. If you want to use a normal distribution, it is also possible and you will get identical results although in this case you must also assign 4 degrees of freedom in the advanced configuration panel of the normal distribution.



**Figure 3.** Advanced configuration of the Normal (Gaussian) distribution.

The correction of the calibration machine with respect to the standard machine,  $\Delta c$ , can also be split into two terms, the mean of the experimental variance of the standard machine  $z_s$ , from the measuring machine,  $z$ , so  $\Delta c$  can be rewritten:

$$\Delta c = z_s + z \quad \text{Eq. 23}$$

For the variables  $z_s$  and  $z$ , the square root of the experimental variance is given, of 0.10 units and 0.11 units respectively. Applying the same method as for  $d_{rep}$  in both cases the number of observations is 6, therefore the degrees of freedom will be 5 for the two variables,

in a t distribution with a value of 0 and standard deviation  $0.10/\sqrt{5} = 0.04082$  and  $0.11/\sqrt{5} = 0.04491$  for  $z_s$  y  $z$  respectively.

For the final model, then it can be typed in the MCM Alchimia (Alchimia Project, s.d.), equation set field:

$$h\_Rockwell = (100 - d - \Delta c - \Delta b - \Delta s)$$

$$d = dval + dres + drep$$

$$\Delta c = z_s - z$$

Next, the probability distribution set is configured:

**Table 3.** Simulation data of example 5. (1) This input quantity was configured with a Normal distribution including degrees of freedom data from the advanced settings panel. However, it is possible to assign a t distribution with the same standard deviation and degrees of freedom, obtaining identical results.

| Quantity (Qty)   | Unit | Probability distribution function (PDF) | Value, Mean or Expectation (Val) | Standard deviation of semi-width interval (dev/hi) | Special PDF properties |                         |                           |                           |
|------------------|------|---|----------------------------------|--|------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                  |      |   |                                  |  | % Reliability (Rlty)   | Degrees of freedom (Df) | Pooled standard deviation | Pooled degrees of freedom |
| $\Delta b$       | HRC  | Triangular                              | 0                                | 0.27   |                        |                         |                           |                           |
| $\Delta s^{(1)}$ | HRC  | Normal                                  | 0                                | 0.5  | 65                     | 4                       |                           |                           |
| $dval$           | HRC  | Constant                                | 36                               |  |                        |                         |                           |                           |
| $drep$           | HRC  | Normal                                  | 0                                | 0.20125  |                        |                         |                           |                           |
| $dres$           | HRC  | Rectangular                             | 0                                | 0.05   |                        |                         |                           |                           |
| $z_s$            | HRC  | t Student                               | 0                                | 0.04082  |                        |                         |                           |                           |
| $z$              | HRC  | t Student                               | 0                                | 0.04491  |                        |                         |                           |                           |

**Example 6. Additive mathematical model (from: JCGM 101:2008, 9.2)**  
**Topic: Validation of GUM results with MCM**

Supplement 1 to the guide addresses the use of the Monte Carlo method when Mathematical Models make the application of GUM difficult. However, it is possible to solve them by both methods with the use of MCM Alchimia (Alchimia Project, s.d.). This example shows a simple case where the impact of the real distribution of the measurand obtained by MCM on the coverage interval and the departure from the coverage interval obtained for the

same probability can be seen, by means of the approximation to a normal distribution applying the GUM method. The measuring problem is a sum of 4 terms in three different sets of PDF:

$$Y = X_1 + X_2 + X_3 + X_4 \quad \text{Eq. 24}$$

Case 1:  $X_i$  Gaussian PDF of mean = 0 and standard deviation = 1

Case 2:  $X_i$  Rectangular PDF of mean = 0 and semi-width interval = 1

Case 3: same as case 2 but with  $X_4$  rectangular of mean = 0 and semi-width 10

In all cases, the numerical tolerance of the expanded uncertainty and the difference between the values obtained by GUM and MCM are studied to assess whether the GUM method can be considered adequate for the model or validated by MCM.

### Example 7. Mass calibration (from: JCGM 101:2008, 9.3)

#### Topic: Complex mathematical models

This example refers to the calibration of a weight  $W$  by comparison with a reference weight  $R$ . The mathematical model of the test is determined by the following equation:

$$\delta m = (m_{R,c} + \delta m_{R,c}) * \left[ 1 + (\rho_a - \rho_{a0}) \left( \frac{1}{\rho_W} + \frac{1}{\rho_R} \right) \right] - m_{nom} \quad \text{Eq. 25}$$

Where  $\delta m$  the deviation of the mass of the sample weight  $W$  with respect to the nominal value,  $m_{R,c}$  the mass of the standard weight,  $\delta m_{R,c}$  the difference in mass between  $W$  and  $R$ ,  $\rho_a$  the air density during the test.  $\rho_{a0} = 1.2 \text{ kg/m}^3$ , is the air density in the definition of conventional mass,  $\rho_W$  and  $\rho_R$  density of weight  $W$  and weight  $R$  respectively.

The objective of the treatment in this example is to show the greater ease offered by the MCM method compared to the GUM approach, due to the mathematical complexity of the model and the avoidance of individual symbolic derivation of the input quantities with respect to the measurand function. The use of MCM Alchimia (Alchimia Project, s.d.), makes obtaining a classic GUM uncertainty budget simple, without requiring either knowing the partial derivatives in the model. It is necessary to note that the software does not perform symbolic derivation, for the input quantities, rather they are calculated by numerical approximation, according to the Kragten method (Kragten, 1995). Assuming that the standard uncertainties of the input quantities are much less than their value, the sensitivity coefficients (partial derivatives) can be obtained by approximation to the tangent value of the measurand function:

$$\frac{\delta_f}{\delta_x} = \frac{y(x_i + u(x_i)) - y(x_i)}{u(x_i)} \quad \text{Eq. 26}$$

According to the established in the example, the equation to type in the software can be:

$$\delta m = (m_{RC} + \delta m_{RC}) * (1 + (\rho a - \rho a 0) * (1/\rho W + 1/\rho R)) - m_{nom}$$

The set of values to configure the PDFs are detailed in Table 4.

**Table 4.** Example 7 simulation data.

| Quantity (Qty)         | Unit              | Probability distribution function (PDF) | Value, Mean or Expectation (Val) | Standard deviation or semi-width interval (dev/hi) |
|------------------------|-------------------|---|----------------------------------|--|
| <b>m<sub>RC</sub></b>  | g                 | Normal                                  | 100000                           | 0.050  |
| <b>δm<sub>RC</sub></b> | g                 | Normal                                  | 1.234                            | 0.020  |
| <b>ρa</b>              | kg/m <sup>3</sup> | Rectangular                             | 1.2                              | 0.10   |
| <b>ρa0</b>             | kg/m <sup>3</sup> | Constante                               | 1.2                              |  |
| <b>ρW</b>              | kg/m <sup>3</sup> | Rectangular                             | 8000                             | 1000   |
| <b>ρR</b>              | kg/m <sup>3</sup> | Rectangular                             | 8000                             | 50   |
| <b>m<sub>nom</sub></b> | g                 | Constante                               | 100000                           |  |

## RESULTS AND DISCUSSION

**Example 1. Calibration of end gauge blocks.** After running the simulation for a 99% coverage probability, the following results are obtained according to GUM and MCM.

| MCM results  | GUM results   |
|--|---|
| Mean = 50.000838                                       | Value = 50.000838                                       |
| Standard Deviation = 3.420201e-5                       | Combined standard uncertainty = 3.2e-5                  |
| Median = 50.0008381                                    | Effective degrees of freedom = 17                       |
| half-width of the interval = 8.936e-5                  | Coverage factor = 2.9                                   |
| Confidence interval (p = 99%): [ 50.00075 , 50.00093 ] | Confidence interval (p = 99%): [ 50.000746 , 50.00093 ] |
| <b>Classic expression: 50.000838 ± 8.9E-05</b>         | <b>Results: U<sub>99</sub> = 50.000838 ± 9.2e-5</b>     |

Numerical tolerance of GUM uncertainty: 5.0e-7  
 Difference MCM-GUM: 3.1e-6

**Figure 4.** Summary results of GUM and MCM for Example 1.

As expected, the results are close to those shown by the reference document, except for small differences due to rounding. It is observed that the results obtained by Monte Carlo are identical to those obtained when the GUM method is applied including higher order terms in the Taylor series approximation, JCGM 100:2008 H.1.7 (BIPM, et al., 2008a).

**Example 2. Resistance measurement.** For this example, the following results are found for resistance R according to the GUM and MCM approaches:

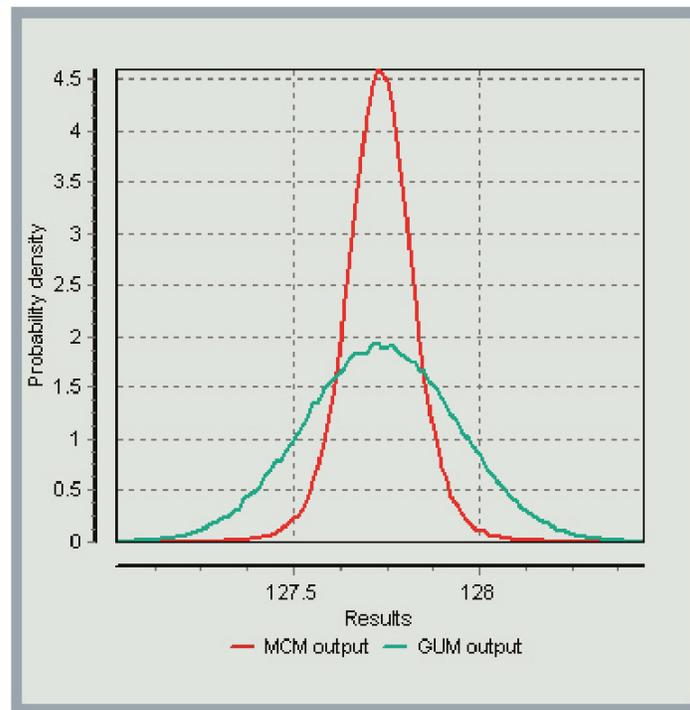
| MCM results   | GUM results  |
|---|--|
| Mean = 127.7320254                                      | Value = 127.73   |
| Standard Deviation = 9.952515e-2                        | Combined standard uncertainty = 7.0e-2                     |
| Median = 127.7320145                                    | Effective degrees of freedom = 3.4                         |
| half-width of the interval = 2.955e-1                   | Coverage factor = 5.8                                      |
| Confidence interval (p = 99%): [ 127.43542 , 128.0264 ] | Confidence interval (p = 99%): [ 127.321018 , 128.143032 ] |
| <b>Classic expression: 127.73 ± 0.30</b>                | <b>Results: <math>U_{99} = 127.73 \pm 0.41</math></b>      |

*Numerical tolerance of GUM uncertainty: 0.005  
Difference MCM-GUM: 0.1*

**Figure 5.** Summary results for example 2.

The results obtained for  $u_R$  are equivalent to those indicated in table H.3 of the guide. At this point it should be noted that there are significant differences between the results obtained by both methods for the expanded uncertainty value.

This is mainly due to the form of the probability distribution function presented by the Monte Carlo random sample. Since the distribution of the measurand departs from a Normal or t distribution, the uncertainties obtained by GUM differ from those obtained by MCM. In these cases, the standard uncertainty calculated according to the GUM approach is no longer a reliable representation of the actual uncertainty. Figure 6 shows the resulting functions for GUM and MCM, where the difference between the curves can be seen.



**Figure 6.** Graph with the resulting GUM and MCM curves.

**Example 3. Calibration of a thermometer.** This example was solved in the same way as the reference document by using correlated variables, obtaining the following results for  $R$ .

| MCM results   | GUM results   |
|---|---|
| Mean = -0.1493831   | Value = -0.1494   |
| Standard Deviation = 6.689289e-3  | Combined standard uncertainty = 4.1e-3                        |
| Median = -0.1493871   | Effective degrees of freedom = ∞                              |
| half-width of the interval = 1.312e-2   | Coverage factor = 1.95  |
| Confidence interval (p = 95%): [-0.16251 , -0.13627 ]                                       | Confidence interval (p = 95%): [-1.5745e-1 , -1.4132e-1 ]     |
| <b>Classic expression: (-0.149 ± 0.013) °C</b>  | <b>Results: <math>U_{95} = (-0.1494 \pm 8.1e-3)</math> °C</b> |
| <i>Numerical tolerance of GUM uncertainty: 5.0e-5</i><br><i>Difference MCM-GUM: -5.1e-3</i> |   |

**Figure 7.** Results of Example 3 for the mathematical model using regression parameters.

**A different approach to the solution.** The previous development has the difficulty of the mandatory using of  $r$  ( $y_1, y_2$ ) or, otherwise, it has to be redo the least-squares fitting after shifting the x-axis to a value for which the covariance between the regression parameters is null (eg choosing a value of  $t_0 = 24.0085$  in this example). There is, however, an available feature in MCM Alchimia (Alchimia Project, s.d.), for models with calibration curves prediction, that dispense with the correction due to correlations. This approach involves using two functions:  $Reg_y(x)$  to predict a value in ordinates ( $y$ ) from a known value on the x-axis; and  $Reg_x(y)$  similar to the previous one but exchanging axes, that is, to predict a value of the

independent variable (x-axis) from a value of the dependent variable (y-axis). The latter case is common in analytical chemistry measurements, for example, to determine the concentration of a sample from its absorbance value, by means of a previously established calibration or standard curve. The calibration curve should show the concentration in abscissa and the absorbance in ordinate.

The mathematical model to type in the field of software equations, after connecting the curve, will then be:

$Corr = REG\_Y(tk-tr)$ , where  $tk$  is the temperature to predict its correction and  $tr$  the reference temperature.

This is the recommended method to deal with mathematical model of measurements involving least squares analysis. Finally, the results obtained by this method are identical to those calculated using regression parameters, with the advantage of dispensing with the study of correlations or other lateral calculations.

**Example 4. Measurement of activity.** The results obtained with MCM Alchimia (Alchimia Project, s.d.), for AX according to the GUM and Monte Carlo methods are shown in the following graph. This result is identical in both presented solution approaches.

| MCM results   | GUM results  |
|---|--|
| Mean = 0.4301124                                    | Value = 0.430  |
| Standard Deviation = 9.817856e-3                    | Combined standard uncertainty = 8.0e-3                 |
| Median = 0.4299745                                  | Effective degrees of freedom = 15                      |
| half-width of the interval = 1.924e-2               | Coverage factor = 2.1                                  |
| Confidence interval (p = 95%): [ 0.4113 , 0.44979 ] | Confidence interval (p = 95%): [ 0.412462 , 0.447763 ] |
| <b>Classic expression: 0.431 ± 0.019</b>            | <b>Results: <math>U_{95} = 0.430 \pm 0.018</math></b>  |

Numerical tolerance of GUM uncertainty: 5.0e-4  
Difference MCM-GUM: -1.6e-3

**Figure 8.** Summary of results from Example 4.

**Example 5. Rockwell hardness measurement.** The results obtained in this example are summarized in the following figure.

| MCM results  | GUM results  |
|--|--|
| Mean = 63.9985362<br>Standard Deviation = 0.5921713<br>Median = 63.9980023<br>half-width of the interval = 1.158e0<br>Confidence interval (p = 95%): [ 62.8416 , 65.15663 ]<br><b>Classic expression: (64.0 ± 1.2) HRC</b> | Value = 64.0<br>Combined standard uncertainty = 0.5542<br>Effective degrees of freedom = 229<br>Coverage factor = 1.97<br>Confidence interval (p = 95%): [ 62.906708 , 65.090364 ]<br><b>Results: <math>U_{95} = (64.0 \pm 1.1)</math> HRC</b> |
| <i>Numerical tolerance of GUM uncertainty: 0.05<br/>           Difference MCM-GUM: -0.1</i>  |  |

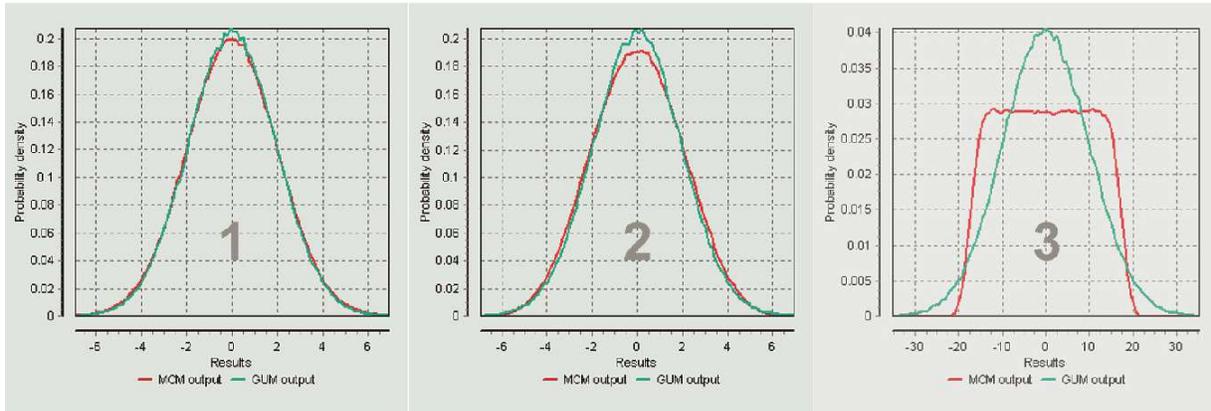
**Figure 9.** Summary of results from Example 5.

**Example 6. Additive mathematical model.** The results obtained for the three sets of distributions are shown in the following table, expressed as half-width of the coverage interval, equivalent to the expanded uncertainty, although expressed with more significant digits to enable the comparison between both methods:

**Table 5.** Results for three sets of distributions.

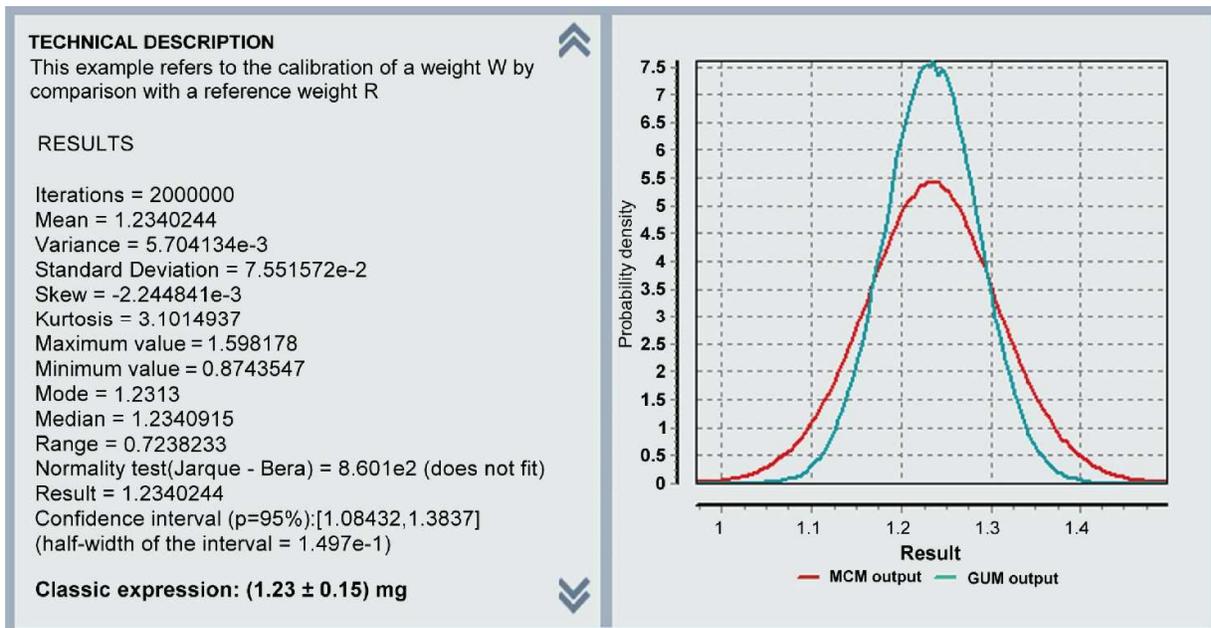
| Case | Semi-width GUM | Semi-width MCM | Difference GUM-MCM | Numerical tolerance ( $\delta$ ) | Valid? |
|------|----------------|----------------|--------------------|----------------------------------|--------|
| 1    | 3.900          | 3.919          | 0.019              | 0.05                             | SI     |
| 2    | 3.900          | 3.877          | 0.023              | 0.05                             | SI     |
| 3    | 19.79          | 17.02          | 2.8                | 0.5                              | NO     |

In the third case, it does not comply with the validation of GUM by MCM, because the largest contributor of the uncertainty is rectangular, resulting in a departure from the application conditions of the Central Limit Theorem. In those cases, the GUM approach is not precise obtaining a uncertainty value. The following figure shows the graphs of the results for the three cases where you can see the difference between models 1 and 2 that met the validation and 3 that did not.



**Figure 10.** Chart of results of GUM and MCM for 3 cases.

**Example 7. Mass calibration.** The following figure shows the results window of the program for the Monte Carlo method. It can be seen that the result is identical to that obtained in the reference document.



**Figure 11.** MCM Alchimia results window for example 7 (Alchimia Project, s.d.).

The data on the left side, shows the statistical data of the simulated random sample and on the right side is plotted the real distribution obtained by the simulation, and the normal distribution of the GUM method with first-order terms. The difference between the two curves explains the differences between the uncertainty results for both approaches.

\*The complete calculation models por MCM Alchimia used in the examples in this technical note can be viewed at the link: <https://ojs.latu.org.uy/index.php/INNOTEC/article/view/547>

## CONCLUSIONS

Although there are a large number of software applications available for estimating uncertainties, the treatment of measurements in real tests often has characteristics that make it difficult to process them by these applications, for example, assigning reliability percentages to uncertainties type B, interpolation in calibration curves, simulation of regression coefficients, application of the Monte Carlo method to correlated variables, etc.

The examples in the JCGM 100: 2008 (BIPM, et al., 2008a) and JCGM 101: 2008 (BIPM, et al., 2008b) reference guides present many of these aspects which are addressed in this technical note. This work shows that the MCM Alchimia software (Alchimia Project, s.d.) implements many features that make it able to deal with special situations or complex mathematical models in a simple way. Methods detailed here not only used to ease the process, but also to reduce the possibility of errors that are commonly inadvertent in uncertainty quantification, for example, the non-consideration of correlation between regression coefficients, or use basic Welch-Satterthwite formula in order to calculate effective degrees of freedom with non-independent quantities.

Moreover, MCM Alchimia (Alchimia Project, s.d.), puts at disposal unusual relevant information for example, the comparison of confidence intervals by GUM and MCM in the summary of results, which allows validation of the classic calculations according to JCGM 101: 2008 (BIPM, et al., 2008b) without requiring any side calculation, or the complete simulated sample for external worksheet treatment or analysis.

Finally, all the obtained outcomes using the software are identical or very close to those indicated in the reference documents. Therefore, although it is necessary to carry out additional tests to consider MCM Alchimia (Alchimia Project, s.d.), fully validated, these examples represent a form of validation of the software for the topics and features discussed.

## REFERENCES

- Alchimia Project, s.d. *MCM Alchimia, MCM & GUM uncertainty estimation engine* [On line]. Version 5. [s.l.]: Alchimia Project. [Accessed: June 15, 2020] Available at: <http://www.mcm-alchimia.com>
- BIPM, IEC, IFCC, ILAC, ISO, IUPAC, IUPAP and OIML, 2008a. *JCGM 100:2008 GUM 1995 with minor corrections. Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement*. [s.l.]: JCGM.
- BIPM, IEC, IFCC, ILAC, ISO, IUPAC, IUPAP and OIML, 2008b. *JCGM 101:2008 Evaluación of measurement data – Supplement 1 to the Guide to the expression of uncertainty in measurement – Propagation of distributions using a Monte Carlo method*. [s.l.]: JCGM
- BIPM, IEC, IFCC, ILAC, ISO, IUPAC, IUPAP and OIML, 2012. *JCGM 200:2021 International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM)*. [s.l.]: JCGM

- Castrup, H., 2010. A welch-satterthwaite relation for correlated errors [On line]. In: *Meas. Sci. Conf., Pasadena*. [Accessed: April 16, 2020]. Available at: <https://www.semanticscholar.org/paper/A-Welch-Satterthwaite-Relation-for-Correlated-1-Castrup/7c9a41aa3cce0bb79e69bc820369c4e2ec1a7e3c>
- Constantino, P., 2013. Computational aspects in uncertainty estimation by Monte Carlo Method [On line]. In: *INNOTECH*, 8, pp.13-22. [Accessed: April 16, 2020]. Available at: <https://ojs.latu.org.uy/index.php/INNOTECH/article/view/214>
- Kragten, J., 1995. A standard scheme for calculating numerically standard deviation and confidence intervals. In: *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 28(1), pp.89-97. DOI: [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(95\)80042-8](https://doi.org/10.1016/0169-7439(95)80042-8)
- Santana, M. and Kalid, R., 2019. Fundamentos estadísticos para la evaluación de la incertidumbre en las calibraciones [On line]. In: CENAM. *Workshop on Statistic, Data Analysis and Measurement Uncertainty for Meteorology*. Querétaro, México (02 de diciembre de 2019). Querétaro: CENAM. [Accessed: April 16, 2020]. Available at: <https://zenodo.org/record/4021356#.YBzRXKdKjDd>. DOI: <http://doi.org/10.5281/zenodo.4021356>
- Willink, R., 2007. A generalization of the Welch–Satterthwaite formula for use with correlated uncertainty components. In: *Metrologia*, 44(5), pp.340.