

INNOTEC ISSN 1688-6593 [en línea]

es una revista científica arbitrada editada por el Laboratorio Tecnológico del Uruguay.

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

EDITOR ASOCIADO

Dr. Facundo Bordet

Área de Gestión Ambiental, Gerencia de Ingeniería y
Planeamiento, Comisión Técnica Mixta de Salto Grande,
Argentina-Uruguay

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, contiene artículos origina-
les 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 dirigi-
da a académicos, investigadores y técnicos de la comunidad
científica uruguaya e internacional.

INNOTEC se encuentra indexada en las siguientes bases de
datos: Latindex, Google Académico, Fuente
Académica Premier de EBSCOhost y DOAJ.



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.

En esta edición se incluye el artículo original titulado "Nuevas
metodologías para el análisis de microcistinas en peces.
Estudio de *Astraloheros facetus* expuestos in vitro", basado en
una investigación cuyo resumen fue presentado oralmente en el
Foro sobre Mitigación de Eutrofización y Taller sobre Ciano-
bacterias, que se realizó del 27 al 29 de noviembre de 2019, en
el Complejo Hidroeléctrico Salto Grande (Argentina-Uruguay).

INNOTEC - NÚMERO 20

Julio-diciembre de 2020

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

DISEÑO Y ARMADO

Happen Marketing

hola@happenmarketing.com

<https://happenmarketing.com>

SUMARIO

Artículos

- 10 **Nuevas metodologías para el análisis de microcistinas en peces. Estudio de *Astraloheros facetus* expuestos in vitro**
New methodology in the determination of microcystins in fish. Study of *Astraloheros facetus* exposed in vitro
Badagian Baharian, Natalia; Letamendia, Maite; Pérez, Macarena; Carnevia, Daniel; Brena, Beatriz
- 30 **Water flow and temperature as main factors that regulate phytoplankton and cyanobacterial blooms in a large subtropical river**
El caudal y la temperatura del agua son los principales factores que regulan el fitoplancton y las floraciones de cianobacterias en un gran río subtropical
Ferrari, Graciela
- 67 **Modelo de calidad del agua subterránea mediante el uso combinado del análisis de componentes principales (ACP) y regresiones lineales múltiples (RLM). Caso de estudio: acuíferos de Maturín, Monagas, Venezuela**
Groundwater quality model through the combined use of principal component analysis (PCA) and multiple linear regression (MLR). Case study: Maturín's aquifers, Monagas, Venezuela
Gil Marín, José Alexander
- 89 **Implementación de la datación mediante ^{210}Pb - ^{137}Cs en Uruguay para el reconocimiento de la variabilidad climático-ambiental del Holoceno superior. Caso de estudio: Laguna de las Nutrias, Rocha, Uruguay**
Dating through ^{210}Pb - ^{137}Cs implementation in Uruguay in the recognition of climatic-environmental variability of the upper Holocene. Case study: Laguna de las Nutrias, Rocha, Uruguay
Azcune, Germán; Pérez Parada, Andrés; Fornaro, Laura
- 106 **Efecto de la variedad y de la humedad de cosecha en la temperatura de transición vítrea de variedades uruguayas de arroz**
Effect of rice variety and harvest moisture content on the glass transition temperature of Uruguayan rice varieties
García Llobodanin, Laura; Ponce de León, Natalia; Moreira, Sebastián; Billiris, Alejandra
- 117 **Aplicación del Código de Barras de ADN (DNA Barcoding) para la identificación de especies vegetales de interés industrial**
Application of DNA Barcoding for the identification of plant species of industrial relevance
Rey Bentos, Fabiana; Capdevielle Sosa, Fabián
- 139 **Atropello de mamíferos en la región Este de Uruguay y su relación con los atributos del paisaje**
Run-over of mammals in Uruguay's Eastern Region and its relationship with landscape attributes
Serrón, Agustina; Coitiño, Hugo; Segura, Ángel

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 INNOTEC 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 para recibir instrucciones para el envío de artículos a nuestro proyecto editorial.

CÓDIGO ÉTICO DE INNOTEC

La revista INNOTEC 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, Meteorología 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 <http://ojs.latu.org.uy> 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 dirijase al correo electrónico de referencia 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 o artístico de un documento.

Título. Refleja el contenido del texto con precisión, en un máximo de dos líneas. 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 mismos en tablas y figuras.

Discusión (Conclusión). Se sigue el orden de presentación o el orden de importancia de los resultados. Se priorizan aquellos resultados que surgieron del diseño experimental. Se define y diferencia claramente el aporte del trabajo en relación al conocimiento previo.

Agradecimientos. Breve reconocimiento a quienes colaboraron en la producción del artículo y/o que permitieron el desarrollo de la investigación.

Referencias y citas en el texto. 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^o de edición. Lugar de edición: editorial. (Serie; N^o). ISBN (Este último si se posee)

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. 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.bfah.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.

Nuevas metodologías para el análisis de microcistinas en peces. Estudio de *Astraloheros facetus* expuestos in vitro

New methodology in the determination of microcystins in fish. Study of *Astraloheros facetus* exposed in vitro

Novas metodologias para a análise de microcistinas em peixes. Estudo de *Astraloheros facetus* expostos in vitro

RECIBIDO: 21/4/2020 → APROBADO: 27/5/2020 ✉ bbrena@fq.edu.uy

✉ BADAGIAN BAHARIAN, NATALIA (1); LETAMENDIA, MAITE (2); PIREZ, MACARENA (3); CARNEVIA, DANIEL (2); BRENA, BEATRIZ (1).

(1) ÁREA BIOQUÍMICA, DEPARTAMENTO DE BIOCENCIAS, FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, URUGUAY.

(2) ÁREA ACUICULTURA Y PATOLOGÍA DE ORGANISMOS ACUÁTICOS, FACULTAD DE VETERINARIA, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, URUGUAY.

(3) ÁREA INMUNOLOGÍA, DEPARTAMENTO DE BIOCENCIAS, FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, URUGUAY.

RESUMEN

La alta incidencia de floraciones de cianobacterias productoras de microcistinas en el país y la región representa un riesgo muy elevado para humanos y animales. A fin de estudiar el impacto y la presencia de las microcistinas (MCs) en animales, es importante disponer de métodos simples de bajo costo. Como primera aproximación a estos objetivos en peces, se estudiaron *Astraloheros facetus* (Castañetas) expuestas a una floración de *Microcystis spp* (MCs 60 y 600 µgMCs/L) en un bioensayo subcrónico (18 días). Si bien no hubo mortalidad, la histopatología mostró infiltración grasa en el hígado, más relevante en los peces expuestos a la mayor concentración. Para analizar MCs en pescados se optimizaron dos métodos inmunoquímicos sensibles basados en un anticuerpo recombinante de llama (*nanobody*) de alta especificidad: ELISA y MALDI-TOF cuantitativo, utilizando partículas magnéticas funcionalizadas. Los métodos fueron recientemente desarrollados localmente. La excelente correlación ELISA/MALDI-TOF ($r_{\text{Spearman}} = 0,988$, $p < 10^{-7}$) resalta el potencial de este ELISA como herramienta simple y costo-efectiva para minimizar las muestras a analizar por métodos de referencia. Las concentraciones de MCs en las Castañetas fueron relevantes, acordes con

bioensayos en otras especies y peces de la naturaleza. Esto destaca la importancia de analizar MCs en pescado para consumo.

PALABRAS CLAVE: cianobacterias, cianotoxinas, inmunoensayos.

ABSTRACT

The high incidence of cyanobacterial blooms producing microcystins in Uruguay and its region represent a very high risk for humans and animals. To study the impact and the presence of microcystins (MCs) in animals, it is important to use simple, low-cost methods. As a first approach to these objectives in fish, a subchronic bioassay (18 days) was performed with *Astraloheros facetus* (Castañetas) exposed to a *Microcystis spp.* bloom containing MCs (60 and 600 µg MCs/L). Even though there was no mortality, the histopathology showed fatty infiltration of the liver, which was more relevant in fish exposed to the highest concentration. To analyze MCs in tissues, two sensitive immunochemical methods based on a highly specific recombinant llama antibody (*nanobody*) were optimized: ELISA and quantitative MALDI-TOF, using functionalized magnetic particles. The methods were recently developed locally. The excellent correlation ELISA/MALDI-TOF (r Spearman = 0.988, $p < 10^{-7}$), highlights the potential of this ELISA as a simple and cost-effective tool to minimize the samples to be analyzed by reference methods. The concentrations of MCs in tissue of *Astraloheros facetus* were relevant, consistent with bioassays in other species and fish from nature. This highlights the importance of analyzing MCs in fish for consumption.

KEY WORDS: cyanobacteria, cyanotoxins, immunoassays.

RESUMO

A alta incidência de florações de cianobactérias produtoras de microcistinas no país e na região representa um risco muito elevado para humanos e animais. Para avaliar o impacto e a presença de microcistinas (MCs) em animais, é importante dispor de métodos simples e de baixo custo. Como primeira aproximação a esses objetivos em peixes, *Astraloheros facetus* (Castañetas), expostos a uma floração de *Microcystis spp.*, contendo microcistinas (60 e 600 µgMCs/L), foram estudados em um bioensaio subcrônico (18 dias). Embora não houve mortalidade, a histopatologia mostrou alteração tipo infiltração gordurosa no fígado, mais relevante em peixes expostos à maior concentração. Para a análise de microcistinas em tecidos, dois métodos imunoquímicos sensíveis, recentemente desenvolvidos localmente, baseados em um anticorpo de chama recombinante altamente específico (*nanobody*) foram otimizados: ELISA e MALDI-TOF quantitativo, usando partículas magnéticas funcionalizadas. A excelente correlação ELISA / MALDI-TOF (r Spearman = 0,988, $p < 10^{-7}$) destaca o potencial desse ELISA como uma ferramenta simples e econômica, para minimizar as amostras a serem analisadas por métodos de referência. As concentrações de MCs no tecido de Castañetas foram relevantes, de acordo com bioensaio em outras espécies e peixes da natureza. Isso destaca a importância da análise de MCs em peixes para consumo.

PALAVRAS-CHAVE: cianobactérias, cianotoxinas, imunoensaio.

INTRODUCCIÓN

En Uruguay, numerosos ecosistemas acuáticos se encuentran eutrofizados y están afectados por floraciones de cianobacterias tóxicas (Chalar, 2009; Aubriot, et al., 2011; Bonilla, et al., 2015). La frecuencia e intensidad de estas floraciones han aumentado en todo el mundo (Huisman, et al., 2018) y en los últimos años se ha observado un crecimiento notorio en los principales cuerpos de agua del país y la región.

En el verano de 2019, las floraciones de los embalses del Río Negro y del Río Uruguay fueron transportadas aguas abajo por los caudales extremos producidos por las intensas lluvias, de forma que alcanzaron todo el Río de la Plata y llegaron incluso a las costas de Rocha (Kruk, et al., 2019). Esto generó alarma y afectó fuertemente el uso recreativo de las playas durante el verano. Las principales causas de estas floraciones, tales como el aporte de nutrientes a los cursos de agua derivados de la intensificación agrícola y la falta de tratamiento de las aguas residuales domésticas e industriales, no son fácilmente reversibles a pesar de las iniciativas para corregirlas (Uruguay, 2019). Dado que no se pueden esperar mejoras significativas en el corto plazo, es necesario implementar medidas de mitigación y adaptación que permitan proteger a la población de los riesgos asociados a estas floraciones.

Las microcistinas (MCs) son las toxinas de cianobacterias (cianotoxinas) encontradas más frecuentemente, tanto a nivel regional como global (Dörr, et al., 2010, Svirčev, et al., 2019); y son las que ocasionan la mayoría de los casos de intoxicación reportados (Chorus y Bartram, 1999; Meriluoto, et al., 2017; Svirčev, et al., 2017). En los principales cursos de agua y embalses del país, estas toxinas presentan concentraciones altamente variables (González-Piana, et al., 2017; González-Piana, et al., 2018), que pueden ser muy elevadas, especialmente en ambientes litorales y en playas del Río de la Plata. Las acumulaciones de espuma cianobacterianas pueden alcanzar valores máximos de 10.000 µg/L o más en temporada estival (González-Piana, et al., 2011; Pérez-Schirmer, et al., 2013; Bonilla, et al., 2015). Esto representa un riesgo muy alto para humanos y animales, ya sea por contacto directo o por consumo de agua y alimentos contaminados (Chorus, et al., 2000; Zanchett y Oliveira-Filho, 2013; Meriluoto, et al., 2017).

Las MCs son una familia de más de 240 heptapéptidos cíclicos hepatotóxicos (Figura 1) con diferente composición e isomerización de sus aminoácidos (Niedermeyer, et al., 2014; Qi, et al., 2015; Spooft y Catherine, 2017). La microcistina LR (MC-LR), que presenta Lisina y Arginina en las posiciones 2 y 4 respectivamente, es la variante química más representativa de la familia debido a su alta toxicidad y ocurrencia. En base a un valor de ingesta diaria tolerable de 0,04 µg/kg por día, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha definido un valor guía de 1 µg/L para MC-LR en agua potable (Chorus y Bartram, 1999). Como la mayoría de las variantes son también tóxicas, en muchos países la normativa se refiere a equivalentes de MC-LR (Ibelings, et al., 2014), término que incluye a las diferentes variantes analizadas.

La elevada diversidad estructural de estas cianotoxinas implica la necesidad de utilizar métodos analíticos selectivos de alta performance, como la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), que son de

muy alto costo y complejidad (Meriluoto, et al., 2017; Flores, et al., 2018). Adicionalmente para la cuantificación se necesitan estándares de todas estas variantes químicas, de las cuales la mayoría no están disponibles comercialmente. En función de estas dificultades, diversos métodos sencillos alternativos, especialmente los inmunoensayos, han ganado amplia aceptación para el monitoreo en aguas (Zaffiro, et al., 2016). A nivel país, en los últimos años, el uso de inmunoensayos ha permitido un importante avance en cuanto a las posibilidades de monitoreo y a la disponibilidad de datos de cianotoxinas en cursos de agua (UNESCO, 2009; Bonilla, et al., 2015).

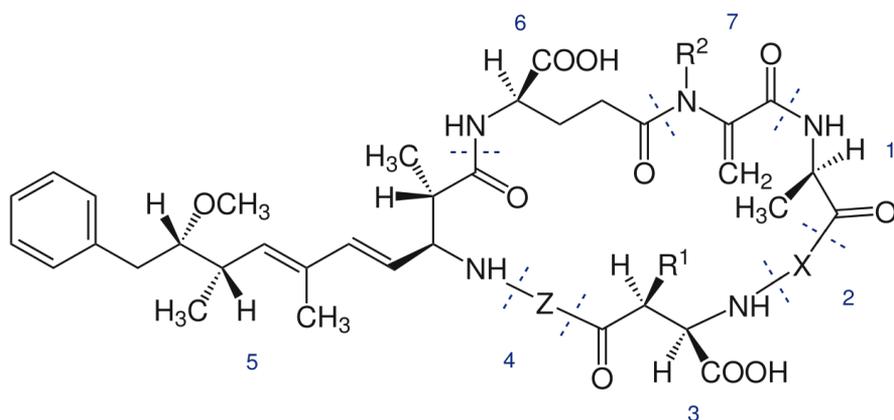


Figura 1. Estructura general de las microcistinas: Ciclo(-D-Ala1-L X2-D-MeAsp3-L-Z4-Adda5-D-Glu6-Mdha7); X y Z son L aminoácidos varios; D-MeAsp: D-eritro- β -ácido metilaspártico; Adda: ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienoico; Mdha: N-etil-dehidroalanina. MC-LR: X es Leucina y Z es Arginina.

Por otro lado, numerosos reportes a nivel internacional muestran que la ingesta de MCs a través de los alimentos (principalmente pescado) podría ser superior a la proveniente del consumo de agua potable (Ibelings, et al., 2014; Poste, et al., 2018) y algunos países han definido valores guía en alimentos (Ibelings, et al., 2014). En Uruguay y otros países en desarrollo, las dificultades de acceso a equipamientos de LC-MS/MS requeridos para el análisis en estas matrices (Meriluoto, et al., 2017, pp.385-389) limitan las posibilidades de generar información sobre la concentración de estas toxinas en pescado.

Los inmunoensayos del tipo ELISA son sencillos, rápidos, no requieren equipamiento costoso, permiten detectar MC-LR y presentan alta reactividad cruzada con las variantes más frecuentes, por lo que son altamente utilizados como metodologías de monitoreo. Sin embargo, los inmunoensayos brindan una respuesta global sin identificar las variantes químicas presentes y pueden presentar problemas de efecto matriz, especialmente en matrices biológicas complejas (Flores, et al., 2018; Font, 2016). Por estas razones, además de su comparación con métodos analíticos de alta performance se requiere una cuidadosa evaluación de su desempeño en matrices biológicas. En base a la experiencia adquirida previamente en el análisis

de aguas, se propone estudiar la aplicabilidad y el desempeño analítico de inmunoensayos que faciliten la determinación de MCs en peces y permitan evaluar el posible impacto en la salud humana y ecosistémica. Como primer paso hacia estos objetivos, en este trabajo se presentan los resultados del análisis de peces provenientes de un bioensayo subcrónico de exposición (18 días) en *Astraloheros facetus* (nv: Castañetas), utilizando una floración productora de MCs en concentraciones frecuentemente encontradas en nuestros cuerpos de agua en temporada estival. La concentración de MCs en los peces expuestos fue analizada por dos métodos inmunoquímicos, recientemente desarrollados en el país, que involucran la utilización de anticuerpos monoclonales recombinantes de llama (*nanobodies*): ELISA (Pírez-Schirmer, et al., 2017) y MALDI-TOF cuantitativo con pre-concentración en partículas magnéticas (Pírez-Schirmer, et al., 2019). Además se realizaron cortes histológicos de los peces para el estudio de los daños provocados por la exposición (histopatología).

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y caracterización de la biomasa de cianobacterias para bioensayo

La biomasa de una floración del Río de la Plata del género *Microcystis* se concentró utilizando una malla de fitoplancton de 20 μm , y se conservó a -80°C en alícuotas de aproximadamente 60 g hasta su utilización. La identificación taxonómica mediante microscopía mostró la presencia de dos especies: *M. aeruginosa* y *M. novacekii*. Como estimación de la biomasa de cianobacterias se determinó Clorofila-a por espectrofotometría (American Public Health Association, American Water Works Association y Water Environment Federation, 2005). Las MCs se analizaron mediante un ELISA basado en anticuerpos policlonales (Pírez-Schirmer, et al., 2013). Las variantes de MCs presentes se identificaron por MALDI-TOF, utilizando espectrómetro de masas Microflex LRF (Bruker Daltonics, Billerica, MS, USA) con láser de nitrógeno a 337 nm, operado en modo positivo con reflector y extracción tardía, optimizado para péptidos en el rango de relación m/z 500Da – 2000 Da. El análisis se realizó con una intensidad del láser de 30%, el cual se disparó 100 veces en 10 posiciones diferentes de cada spot. La calibración del equipo se realizó con estándar para calibración de péptidos (Bruker Daltonics). La identificación de las relaciones m/z obtenidas se realizó comparando con las reportadas en la recopilación de Spoof y Catherine (2017).

Bioensayo *Australoheros facetus* (Castañetas)

El diseño experimental del bioensayo tuvo como primer objetivo obtener muestras de un pez nativo expuesto en condiciones controladas, similares a las que pueden ocurrir en el ambiente natural, para la evaluación de nuevas metodologías de análisis de toxinas en sus tejidos. Se propuso a su vez, obtener datos preliminares de los daños histopatológicos y las concentraciones de toxinas que son incorporadas en los peces. Los peces fueron obtenidos de un mismo desove de

la especie nativa *Australoheros facetus* (nv: Castañetas), mantenida y cultivada en bioherio. El bioensayo se realizó en acuarios de 20 L, con temperatura, pH y oxígeno disuelto promedios de 21,7°C; 7,5 y 12,5 mg/L respectivamente. Los acuarios contaron con aireación, filtro biomecánico de esponja (RS-430K), y se simuló un fotoperiodo natural (12h luz:12h oscuridad). Los peces se alimentaron diariamente con alimento balanceado para peces en *pellets* (Aqua, Supra). Quince juveniles, de 34,5 - 41,4 mm de largo por acuario (total aproximadamente 17 g de peces), se expusieron durante 18 días a la biomasa caracterizada anteriormente. La exposición se realizó en dos condiciones: 0.75 g de la biomasa/litro de agua (tratamiento 1) y 7.5 g biomasa/litro de agua (tratamiento 2). El contenido de MCs en los tratamientos fue de aproximadamente 60 y 600 µg MCs/L, respectivamente. Las exposiciones se realizaron por duplicado y se incluyeron dos controles sin adicionar floración (6 acuarios en total). El día 10 se adicionó nuevamente biomasa a la misma concentración inicial.

La concentración de toxinas en el agua de cada uno de los acuarios se analizó por triplicado mediante ELISA policlonal, los días 1, 7, 10, 15 y 18. A tiempo final se sacrificaron los peces mediante sobredosis de anestésico (Eugenol) para estudio histopatológico y análisis de MCs. Se utilizaron las técnicas histopatológicas convencionales (inclusión en parafina, obtención de cortes seriados de 5 µm de espesor) con tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E), y observación en microscopio óptico Olympus BX50. Se analizaron dos individuos por acuario (N= 4 por tratamiento).

Extracción de microcistinas de peces

Los peces provenientes de cada acuario se dividieron en dos submuestras de 6 peces cada una, se descabezaron y se homogeneizaron con trituradora. Fracciones de 1,7 g (pescado húmedo) de cada submuestra se extrajeron con 10 mL de una mezcla de acetonitrilo y agua (75:25 v/v) con 1% ácido fórmico. Los extractos se desgrasaron mediante partición líquido-líquido con hexano saturado en acetonitrilo (Geis-Asteigante, et al., 2011), y el solvente se evaporó a 45 °C en un equipo Speedvac concentrator Thermo SPD1010-230. Los extractos se neutralizaron con 1 M Tris-base pH 10, y se completó el volumen hasta 10 mL con agua Milli-Q.

Con el fin de evaluar la recuperación, se realizaron dos fortificaciones de MC-LR en Castañetas blanco, no expuestas en el bioensayo, previas a la extracción de los tejidos y a un nivel de 10 ng MC-LR/g de pescado húmedo, valor guía de acción propuesto en California para MCs en pescado (Butler, et al., 2012, p.4).

Inmunoensayo utilizando anticuerpo monoclonal (*nanobody*)

Los extractos de Castañetas se analizaron mediante un ELISA, con el anticuerpo monoclonal de llama (*nanobody*), como se describe en Pírez-Schirmer y otros (2017) (clon A2.3). El *nanobody* se produjo recombinante en *Escherichia coli* (*E. coli*), biotinilado *in vivo* para facilitar su detección con un conjugado estreptavidina-peroxidasa (Thermo). Se utilizaron placas recubiertas con 100 µL/pocillo de una solución de 60 µg/L de conjugado MC-LR- seroalbúmina bovina (MC-LR-BSA) en buffer fosfato salino (PBS), bloqueadas con gelatina al 0,5% en PBS. El

análisis se realizó por triplicado con 50 μL de la muestra o estándares previamente mezclados en placa de dilución, con 11 μL de Tris 1 M, NaCl 0,27 M, EDTA disódico 0,27 M, BSA 1% a pH 7,5 (Buffer interferencia o BI). Las muestras y estándares preincubados se sembraron en la placa de ELISA y se agregó una solución 7 $\mu\text{g}/\text{L}$ de *nanobody*. Luego de la incubación y etapas de lavados, la detección se realizó con estreptavidina-peroxidasa y posteriormente se agregó solución conteniendo sustrato de la enzima peroxidasa H_2O_2 y 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) en buffer acetato pH 5,5. Las curvas de calibración se realizaron con MC-LR en el rango de concentraciones: 0,1 - 5,0 $\mu\text{g}/\text{L}$ en PBS. Se grafica el porcentaje de absorbancia de cada estándar respecto al cero (%A/Ao) versus la concentración de MC-LR, utilizando ajuste sigmoideal 4PL del software GraphPad Prism 7.

Previo a la realización del bioensayo, se evaluó el efecto matriz mediante curvas de adición en extractos de Castañetas blanco (no expuestas en el bioensayo), en todo el rango de trabajo (10 concentraciones de MC-LR entre 0,1 y 5,0 $\mu\text{g}/\text{L}$ de extracto). En este caso, los análisis se realizaron por cuatuplicado (cada día) y en cuatro días. Se evaluaron las siguientes cifras de mérito: veracidad (recuperación utilizando curvas de calibración en PBS) y precisión intra e inter-ensayo. Los criterios de desempeño analítico de referencia seleccionados fueron los siguientes: recuperaciones en el rango 70-120% y coeficiente de variación (CV) menor que 20% (Meriluoto, et al., 2017, pp.249-251). El límite de cuantificación (LC) se consideró como la mínima concentración en la cual se cumplen estos criterios. Los parámetros de las curvas del ensayo (A_0 ; IC_{50}) en matriz Castañeta y en PBS se compararon utilizando el test extra sum-of-squares F del software Graph Pad Prism 7.0.

Método cuantitativo mediante MALDI-TOF

Se utilizó un método MALDI-TOF cuantitativo ultrasensible (Pírez-Schirmer, et al., 2019). Las MCs de la muestra o estándares se capturaron y concentraron en partículas magnéticas (MagnaBind Streptavidin Beads, Thermo Fischer), conteniendo el *nanobody* anti-MC inmovilizado y un estándar interno (IS: MC-YR modificado con β -mercaptoetanol), el cual posibilitó la cuantificación. Un volumen de 1 mL de estándares y muestras de extracto de Castañetas (dilución 1/4 o superior en PBS conteniendo 0.2 % BSA, en caso de muestras fuera del rango del ensayo) se incubaron con 5 μL de las partículas durante 15 minutos, se realizaron 2 lavados con PBS-Tween 0,1% y 2 lavados con Agua-Tween 0,002%. Las partículas se resuspendieron en 10 μL de una solución 50% ACN - 50% (0,1% ácido trifluoroacético en H_2O), y luego se adicionó 10 μL de matriz para MALDI (Ácido α -cyano-4-hidroxycinámico, CHCA). En estas condiciones la captura permite, además de la purificación del extracto, un factor de concentración de 12,5 veces. Las partículas magnéticas fueron sembradas directamente en la placa de MALDI por triplicado y se dejó secar a temperatura ambiente. El análisis se realizó en un equipo Microflex LRF MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) operado en modo positivo con reflector y extracción tardía usando un láser de nitrógeno de 337 nm. El instrumento fue optimizado en el rango de relación m/z 500 Da-2000 Da, y el láser (intensidad 50%) se disparó 250 veces en 8 lugares individuales por spot (2000 *shots por spot*).

Las curvas de calibración (0,025- 1,0 μg MC-LR/L) y las muestras se analizaron por triplicado, graficando el cociente entre la intensidad del ion correspondiente a la relación m/z de cada MC individual encontrada y del IS.

La evaluación del desempeño del método se realizó utilizando los mismos criterios mencionados anteriormente (Meriluoto, et al., 2017, pp.249-251). Se realizaron adiciones de MC-LR en extracto de Castañetas blanco, no expuestas en el bioensayo (dilución 1/4 del extracto), en tres días, a concentraciones de 0,025, 0,05 y 0,5 $\mu\text{g}/\text{L}$.

RESULTADOS

Bioensayo

La concentración de MCs en la biomasa de cianobacterias utilizada, determinada mediante ELISA, fue 67 mg MCs/Kg y la Clorofila-a 49 mg/Kg. Esta relación MCs/clorofila corresponde a una floración de alta toxicidad (Chorus y Bartram, 1999). En el espectro de MALDI-TOF obtenido para la biomasa (Figura 2), se observa un pico de alta intensidad con relación m/z correspondiente a MC-LR y dos de menor intensidad con relaciones m/z que pueden corresponder a [d-Leu¹] MC-LR y MC-RR, entre otras.

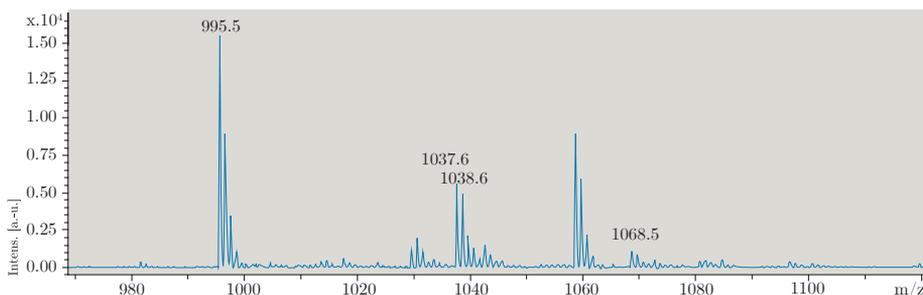


Figura 2. Espectro de MALDI-TOF de la biomasa de cianobacterias utilizada en el bioensayo. (relación m/z según Meriluoto y otros 2017: MC-LR 995,6; [d-Leu¹]MC-LR 1037,6; MC-RR 1038,6; MC-WR 1068,6).

El análisis de MCs del agua de los acuarios mostró que en el día 7 los valores disminuyeron a menos del 2% de la concentración inicial. Para simular una situación ambiental frecuente de reincidencia de las floraciones, el día 10 se reaplicó nuevamente la biomasa a la misma concentración inicial. La concentración de MCs dispersa en los acuarios volvió a decaer rápidamente, y al final del bioensayo (día 18), la concentración residual fue menor al 1% de la obtenida luego de la reaplicación. Las Castañetas sobrevivieron en el transcurso del bioensayo subcrónico en todas las concentraciones de exposición.

Histopatología

En los controles se observó una estructura normal de los principales órganos estudiados: hígado, riñón y tubo digestivo. Se detectó solamente en branquias la presencia de leve edema en las laminillas branquiales.

En los peces expuestos al tratamiento 1 (0,75 g biomasa/L de agua) se observó una alteración de tipo infiltración grasa en la mayor parte del hígado, con algunas zonas de degeneración grasa macrovesicular. Los hepatocitos aumentaron de tamaño con las vacuolas lipídicas intracitoplasmáticas, adquirieron una forma redondeada y desplazaron el núcleo hacia la periferia, otorgando en su conjunto una coloración más pálida (Figura 3). En los peces expuestos al tratamiento 2 (7,5 g biomasa/ L de agua), se observó que esta alteración a nivel hepático fue más intensa, con predominio de degeneración grasa macrovesicular y zonas con escasos núcleos picnóticos. (Figura 3).

Las alteraciones observadas a nivel hepático, compatibles con degeneración grasa, han sido descritas por Preeti y otros (2016) y Acuña y otros (2020), como resultado de la exposición a floraciones conteniendo MCs. En tanto numerosos autores tales como Li y Xie, (2009), Prieto y otros (2008), Le Manach y otros (2018), reportan alteración de la estructura de cordones de hepatocitos con aumento del espacio intercelular, degeneración y necrosis coagulativa.

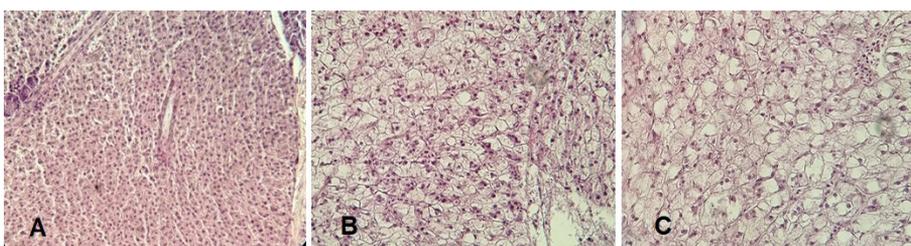


Figura 3. Alteraciones hepáticas en Castañetas expuestas a dos concentraciones de microcistinas. A: Grupo Control, B: Tratamiento 1, C: Tratamiento 2. H&E a 400X. N= 4 por tratamiento.

Evaluación del desempeño analítico de métodos para la determinación de microcistinas en peces

ELISA

En experimentos previos, se observó que el ELISA policlonal presenta un importante efecto matriz en extractos de tejidos de peces (datos no reportados), por lo que en este trabajo se utilizó el ensayo basado en un anticuerpo monoclonal de llama (*nanobody*). En la Figura 4 se reporta el estudio de efecto matriz en extracto de Castañeta adicionado con MC-LR (0.1-5 µg/L de extracto). Se observa que las curvas de adición del ELISA monoclonal en PBS y matriz de pescado no presentaron diferencias significativas de ajuste ($A_0 = 103$ y 94 , $IC_{50} = 0,47$ y $0,56$ respectivamente; $p_{valor} = 0,2146$).

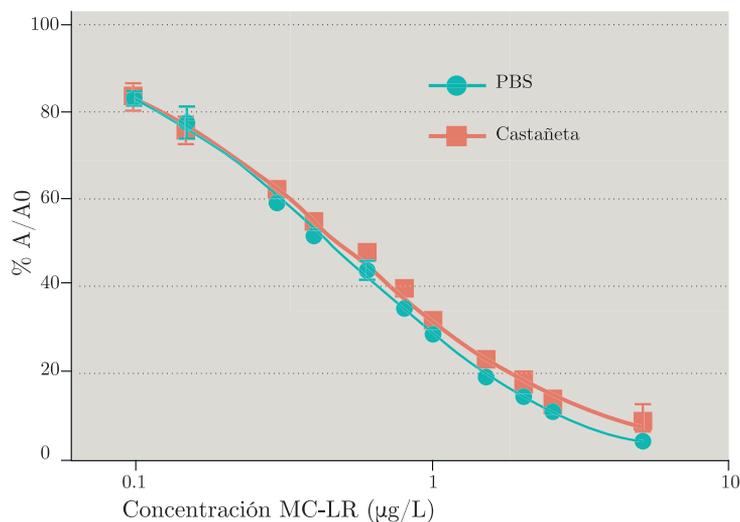


Figura 4. Curvas de adición de MC-LR en matriz extracto de Castañeta y buffer salino PBS, analizados por cuatuplicado.

En la Tabla 1 se presentan los resultados de recuperación y precisión de las adiciones en matriz (extracto de Castañeta blanco), analizadas utilizando la curva de PBS, en todo el rango estudiado, obtenidos en un período de 4 días. En esta matriz, el rango del ensayo que cumple con los criterios analíticos establecidos (recuperación 70-120%, CV < 20%) fue de 0,15 - 5 µg MCs/L. En tanto, el límite de cuantificación del método (LC), fue de 0,15 µg/L (0,9 ng/g pescado húmedo). Los niveles de recuperación de MC-LR en extracto de Castañeta fortificado a un nivel de 10 ng/g pescado húmedo se encontraron en el rango 46%-86%. Estos valores concuerdan con los antecedentes ya reportados (Meriluoto, et al., 2017, pp. 360).

Tabla 1. Recuperación (%) y precisión (CV%) de adiciones en el rango 0,1 - 5 µg MC-LR/L de extracto de Castañeta blanco. Análisis realizados por cuatuplicado cada día, en un período de 4 días.

Concentración (µg MCs/L)	Recuperación %	CV %
5	77	20
2,5	78	14
2	80	13
1,5	81	7
1	83	12
0,8	77	10
0,6	82	8
0,3	94	13
0,15	98	18
0,1	124	26

MALDI-TOF cuantitativo

En la Tabla 2 se presentan los resultados de recuperación y precisión en matriz de extracto de Castañeta blanco (dilución 1/4), analizado por MALDI-TOF cuantitativo, para las tres concentraciones adicionadas dentro del rango de trabajo. La dilución del extracto fue necesaria para lograr la formación de un buen *pellet* de las partículas. El límite de cuantificación fue 0,025 µg/L de dilución de extracto (0,6 ng/g pescado húmedo).

Tabla 2. Recuperación (%) y precisión (CV%) de adiciones en extractos de Castañeta blanco (dilución 1/4). Análisis realizados en triplicado cada día, en un período de tres días.

Concentración adicionada (µgMCLR/L)	Recuperación(%)	CV(%)
0,025	117	11
0,05	104	10
0,5	99	7,5

Concentración de microcistinas en *Australoheros facetus*

Las concentraciones de MCs en las Castañetas del bioensayo, analizadas mediante el ELISA monoclonal, se muestran en la Tabla 3. La mediana de los peces expuestos al tratamiento 1 fue de 7,2 ng MCs/g pescado húmedo y al tratamiento 2 fue de 9,2 ng MCs/g pescado húmedo. Se observó una alta variabilidad en los resultados entre muestras de acuarios con las mismas condiciones de exposición.

Tabla 3. Concentración de MCs en Castañetas expuestas en el bioensayo analizadas por ELISA monoclonal. Se presentan los datos de mediana, mínimo y máximo para las cuatro submuestras de cada tratamiento. Se analizaron dos submuestras de cada acuario por triplicado.

Muestra	Mediana (ngMCs/g pescado)	Mínimo (ngMCs/g pescado)	Máximo (ngMCs/g pescado)
Controles	NC	NC	NC
Tratamiento 1	7,2	3,8	14
Tratamiento 2	9,2	4,7	48

Análisis de muestras por MALDI-TOF cuantitativo

En los extractos de los peces se observaron solamente dos picos (Figura 5), que corresponden a las relaciones m/z de los iones $[M+H]^+$: MC-LR (m/z 995,5) y [L-MeLan] MC-LR (conjugado de MC-LR y cisteína, m/z 1116,6). El pico de MC-LR prevaleció ampliamente sobre el conjugado en todas las muestras analizadas.

Este conjugado con cisteína representa un metabolito de detoxificación en animales, de menor toxicidad que la toxina libre (Schmidt, et al., 2014; Li, et al., 2014).

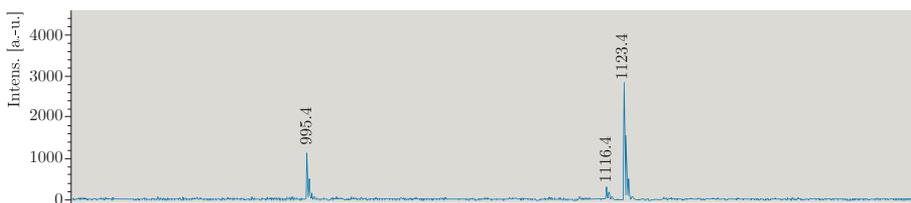


Figura 5. Espectro de MALDI-TOF cuantitativo para Castañetas expuestas al tratamiento 1 durante bioensayo de exposición a floración de cianobacterias. La relación m/z de 1123 corresponde al estándar interno. MC-LR: m/z 995.6; [L-MeLan7]MC-LR: m/z 1116.6 según Meriluoto y otros (2017).

En la Tabla 4 se reportan los resultados de concentración de MC-LR obtenidos por MALDI-TOF cuantitativo. La mediana de los peces expuestos al tratamiento 1 fue de 13 ng MCs/g pescado húmedo y al tratamiento 2 fue de 14 ng MCs/g pescado húmedo. De igual manera que para el ELISA, se observó una alta variabilidad entre muestras con las mismas condiciones de exposición.

En las muestras de Castañetas fortificadas previamente a la extracción, se obtuvieron valores de recuperación en el rango 64-82%, valores que se encuentran de acuerdo a los antecedentes (Meriluoto, et al., 2017, pp.360).

Tabla 4. Concentración de MCs en Castañetas expuestas en el bioensayo, determinadas por MALDI-TOF cuantitativo. Se presentan los datos de mediana, mínimo y máximo para MC-LR para las cuatro submuestras de cada tratamiento. Se analizaron 2 submuestras de cada acuario por triplicado.

Variante	MC-LR		
	Mediana (ngMCs/g pescado)	Mínimo (ngMCs/g pescado)	Máximo (ngMCs/g pescado)
Controles	ND	ND	ND
Tratamiento 1	13	5,9	20
Tratamiento 2	14	7,7	52

Comparación de métodos

En la Figura 6, se muestra la comparación de resultados obtenidos por ambos métodos para los peces del bioensayo ($r_{\text{Spearman}} = 0,98$, $p_{\text{valor}} = 7,424e^{-08}$, $R^2_{\text{Spearman}} = 0.95$, $n = 12$). Si bien el método requiere una mayor evaluación para el estudio de peces provenientes de la naturaleza, se destaca que la correlación ELISA vs. MALDI-TOF cuantitativo para MC-LR fue excelente, lo que resalta el potencial del ELISA con *nanobody* como una herramienta de detección para minimizar el número de muestras analizadas por métodos analíticos de alto costo y performance.

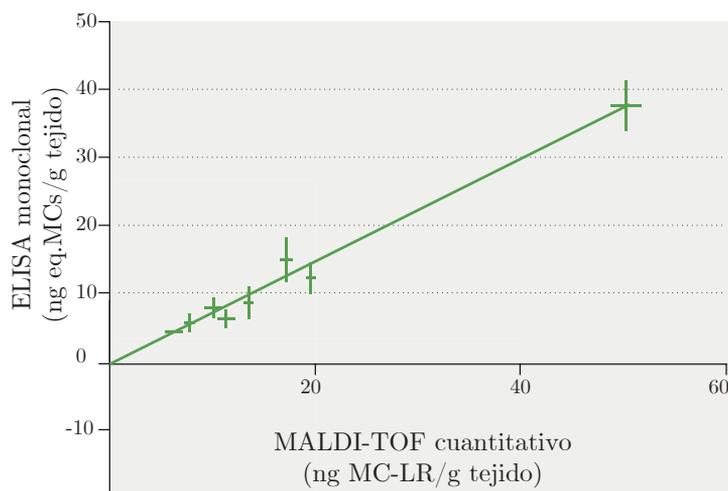


Figura 6. Comparación de resultados de concentración de MCs obtenidos por ambos métodos, en extractos de Castañetasa tiempo final del bioensayo de exposición ($R^2=0,988$).

DISCUSIÓN

El bioensayo de *A. facetus* se realizó utilizando floraciones naturales productoras de MCs en condiciones que usualmente pueden encontrarse en cursos de agua eutrofizados, como en los grandes embalses de los ríos Negro y Uruguay, y en el Río de la Plata. Las concentraciones de MCs contenidas en la biomasa, aplicada tanto en el día inicial del bioensayo como en la reaplicación, decayeron rápidamente en los acuarios. Las razones de este rápido decaimiento de las MCs en el agua pueden ser múltiples, pero es claro que sólo una mínima fracción de la cantidad aplicada se detectó en los peces. Es así que, por ejemplo, en el tratamiento 1 se aplicaron 2400 μg de MCs por pecera de 20 litros (dos veces 1200 μg) y sólo se encontraron en los peces, aproximadamente, 0,12 μg MCs (7,2 ng MC-LR/g pescado, en un total de 17 g de peces). Una vez que las MCs se liberan al agua por ruptura celular, su concentración disminuye a tasas muy variables dependiendo de las condiciones, como resultado de procesos tales como adsorción a material particulado, descomposición química, fotólisis y degradación biológica (Schmidt, et al., 2014). Estos procesos limitan la exposición a las MCs, y el impacto en los peces y la biota.

Aún cuando no se encontró mortalidad, a nivel subcrónico se observaron alteraciones hepáticas en los peces expuestos y no así en los peces control. La infiltración grasa y la degeneración grasa macrovesicular observadas en el hígado han sido reportadas en otros peces frente a floraciones productoras de MCs (Preeti, et al., 2016; Acuña, et al., 2020), y sugieren un efecto de toxicidad en principio reversible, pero que puede conducir a una función celular deteriorada e insuficiencia hepática. Además hay que considerar el efecto sinérgico acumulado de las toxinas con otros componentes tóxicos presentes en la biomasa de cianobacterias, tales como lipopolisacáridos, entre otros, que no han sido suficientemente estudiados (Roegner, et al., 2019).

Es posible que en nuestros sistemas hídricos eutrofizados, eventos de mortandades de peces observados en temporada estival estuvieran relacionados con las floraciones productoras de MCs. Los resultados presentados contribuyen al conocimiento de las lesiones histopatológicas de peces expuestos a floraciones de cianobacterias en el país. Para una mejor identificación de las causas de estas mortandades se deberá continuar profundizando estos estudios.

Los peces expuestos en el bioensayo se utilizaron para estudiar la concentración de MCs mediante nuevas metodologías de análisis. Estos métodos podrían facilitar la evaluación del riesgo de consumo de pescado expuesto a floraciones productoras de MCs. Los inmunoensayos del tipo ELISA son, por su sencillez y alta sensibilidad, herramientas con múltiples ventajas para el análisis de MCs, pero su aplicabilidad en tejidos animales presenta mayores desafíos que su uso en agua. En función de su alta especificidad y selectividad reportada para diferentes analitos, en este trabajo se utilizaron inmunoensayos basados en anticuerpos recombinantes monodominio de llama (*nanobodies*) (González-Sapienza, et al., 2017). De todos modos, es necesario estudiar el efecto matriz del ensayo, ya que múltiples componentes de los extractos podrían interferir en el análisis (Ibelings y Chorus, 2007; Hu, et al., 2017). Los resultados en extractos de Castañetas no expuestas, adicionadas con microcistina-LR en un amplio rango de concentración, evidenciaron un muy buen desempeño del ELISA utilizado en este trabajo.

Otra posible limitación de los inmunoensayos se debe a que, además de las variantes de MCs presentes, podrían detectar metabolitos de detoxificación (conjugados MCs con cisteína y glutatión), que presentan mucho menor toxicidad que las correspondientes toxinas libres (Schmidt, et al., 2014; Li, et al., 2014). Para confirmar y cuantificar la presencia de diferentes variantes de MCs y distinguirlas de sus metabolitos, se utilizó un nuevo método ultrasensible de MALDI-TOF cuantitativo, originalmente validado para aguas y sueros de animales (Pírez-Schirmer, et al., 2019).

La altísima correlación encontrada entre la determinación de MCs por ELISA y la microcistina-LR mediante MALDI-TOF cuantitativo permite visualizar que la utilización del ELISA de *nanobody* tiene muy alto potencial para el estudio de extractos de peces. Sin embargo, debe resaltarse que se requieren experimentos complementarios, incluyendo el análisis de un alto número de peces de diferentes especies expuestos en la naturaleza y la comparación con métodos de referencia como el LC-MS/MS.

Los niveles de toxinas presentes en las Castañetas del bioensayo se encuentran en consonancia con los encontrados en otros bioensayos reportados (Adamovský, et al., 2007; Li, et al., 2004; Dyble, et al., 2011; Cazenave, et al., 2005), e incluso en estudios de la naturaleza (Flores, et al., 2018). Es destacable que esto sucedió a pesar de que las condiciones de los bioensayos antes reportados (especie, tiempo, vía de exposición) fueron diferentes a las del presente trabajo. Otro aspecto relevante es que la tasa de biotransformación de las MCs es muy rápida en peces y depende de la especie, así como del tejido estudiados (Adamovský, et al., 2007; Dyble, et al., 2011). Los valores de vida media de equivalentes de MC-LR (determinados por ELISA) reportados en músculo de *Cyprinus carpio* y *Hypophthalmichthys molitrix* son de 2,8 y 0,7 días, y en hígado de 4,0 y 3,5 días, respectivamente (Adamovský, et al., 2007). Esto implica que puede existir una alta variabilidad del contenido de toxinas en diversos tejidos

de peces, no solamente en función de la especie sino también del tiempo transcurrido luego de la exposición a la floración. Es muy probable que los peces de este bioensayo estuvieran en una etapa avanzada de detoxificación y eliminación, pero igualmente se encontraron en algunas muestras valores de concentración por encima del valor guía de acción de California para MCs en alimentos de 10 ng/g tejido húmedo (Butler, et al., 2012, p.4). Por lo tanto, considerando estos resultados y la intensidad de las floraciones productoras de MCs en los principales cursos de agua del país, resulta importante estudiar el contenido de toxinas en pescado de consumo y profundizar en la validación de métodos sencillos de análisis como los propuestos en este estudio.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la colaboración de Graciela Ferrari del LATU por la identificación de las especies presentes en la floración, de Daniel Sienna y la Unidad de Calidad de Agua del SECCA, Intendencia de Montevideo, por la extracción de la muestra de floración.

Se agradece el apoyo financiero de: ANII-FMV-104085, CSIC Grupos 150725, UdelaR y PEDECIBA. Natalia Badagian recibió becas de posgrado de ANII y de la Comisión Académica de Posgrado, UdelaR.

REFERENCIAS

- Acuña, S., Baxab, D., Lehman, P., Teh, F.C., Deng, D.F. y Tehf, S., 2019. Determining the exposure pathway and impacts of *Microcystis* on Threadfin shad, *Dorosoma petenense*, in San Francisco estuary. En: *Environmental Toxicology*, 39(4), pp.787-798. doi: 10.1002/etc.4659.
- Adamovský, O., Kopp, R., Hilscherová, K., Babica, P., Palíková, M., Pašková, V., Navrátil, S., Maršálek, B. y Bláha, L., 2007. Microcystin kinetics (bioaccumulation and elimination) and biochemical responses in common carp (*Cyprinus carpio*) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) exposed to toxic cyanobacterial blooms. En: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, pp.2687-2693. doi:10.1897/07-213.1.
- American Public Health Association, American Water Works Association y Water Environment Federation, 2005. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21a ed. Washington: APHA. Standard Method 10200 H, aprobado 1994.
- Aubriot, L., Bonilla, S. y Falkner, G., 2011. Adaptive phosphate uptake behaviour of phytoplankton to environmental phosphate fluctuations. En: *FEMS Microbiology Ecology*, 77(1), pp.1-16. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01078.x
- Bonilla, S., Haakonsson, S., Somma, A., Gravier, A., Britos, A., Vidal, L., De León, L., Brena, B.M., 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.

- Butler, N., Carlisle, J. y Linville, R., 2012. *Toxicological summary and suggested action levels to reduce potential adverse health effects of six cyanotoxins*. California: Office of Environmental Health Hazard Assessment, California Environmental Protection Agency.
- Cazenave, J., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A., Amé, M.V., Krause, E., Pflugmacher, S. y Wiegand, C., 2005. Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*: A field and laboratory study. En: *Aquatic Toxicology*, 75(2), pp.178-190.
- Chalar, G., 2009. The use of phytoplankton patterns of diversity for algal bloom management. En: *Limnologica*, 39(3), pp.200-208.
- Chorus, I. y Bartram, J., 1999. *Toxic cyanobacteria in water. a guide to public health significance, monitoring and management*. Londres: E & FN Spon/Chapman and Halled.
- Chorus, I., Falconer, I.R., Salas, H.J. y Bartram, J., 2000. Health caused by fresh water cyanobacteria in recreational water. En: *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 3, pp.323-347.
- Dörr, F.A., Pinto, E., Soares, R.M., Feliciano de Oliveira y Azevedo, S.M., 2010. Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence, toxicity and toxicological assays. En: *Toxicon*, 56, pp.1247-1256.
- Dyble, J., Gossiaux, D., Landrum, P., Kashian, D.R. y Pothoven, S., 2011. A kinetic study of accumulation and elimination of microcystin-lr in yellow perch (*perca flavescens*) tissue and implications for human fish consumption. En: *Marine Drugs*, 9, pp.2553-2571.
- Flores, N.M., Miller, T.R. y Stockwell, J.D., 2018. A global analysis of the relationship between concentrations of microcystins in water and fish. En: *Frontiers of Marine Science*, 5(30). doi: 10.3389/fmars.2018.00030.
- Font-Iribarne, E., 2016. *Cianotoxinas en abrevaderos: peligrosidad y efectos negativos para el Ganado*. Montevideo: Facultad de Ciencias. (Tesis de Maestría).
- Geis-Asteggiante, L., Lehotay, S.J., Fortis, L.L., Paoli, G., Wijey, C. y Heinzen, H., 2011. Development and validation of a rapid method for microcystins in fish and comparing LC-MS/MS results with ELISA. En: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401, pp.2617-2630.
- González-Piana, M., Fabian, D., Delbene, L. y Chalar, G., 2011. Toxics blooms of *Microcystis aeruginosa* in three Río Negro reservoirs, Uruguay. En: *Harmful Algae 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, pp.488–492. DOI: 10.1007/s00128-017-2158-7.
- González-Piana, M., Piccardo, A., Ferrer, C., Brena, B., Pirez, M., Fabian, 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: 10.1007/s00128-018-2446-x.
- González-Sapienza, G., Rossotti, M.A. y Tabares-Da Rosa, S., 2017. Single-domain antibodies as versatile affinity reagents for analytical and diagnostic applications. En: *Frontiers in Immunology*, 8(977). doi: 10.3389/fimmu.2017.00977
- Hu, X., Ye, J., Zhang, R., Wu, X., Zhang, Y. y Wu, C., 2017. Detection of free microcystins in the liver and muscle of freshwater fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. En: *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 52(10), pp. 770-776. doi: 10.1080/03601234.2017.1356670.
- Huisman, J., Codd, G.A, Paerl, H.W., Ibelings, B.W., Verspagen, J.M. y Visser, P.M., 2018. Cyanobacterial blooms. En: *Nature Reviews Microbiology*, 16, pp.471–483.
- Ibelings, B.W. y Chorus, I., 2007. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: a review. En: *Environmental Pollution*, 150, pp.177-192.
- Ibelings, B.W., Backer, L.C., Kardinaal, W.E. y Chorus, I., 2014. Current approaches to cyanotoxin risk assessment and risk management around the globe. En: *Harmful Algae*, 40, pp.63-74.
- Kruk, C., Martínez, A., Martínez de la Escalera, G., Trinchin, R., Manta, G., Segura, A., Piccini, C., Brena, B., Fabiano, G., Pirez, M., Gabito, L., Alcántara, I. y Yannicelli, B., 2019. Floración excepcional de cianobacterias tóxicas en la costa de Uruguay, verano 2019. En: *INNOTECH*, 18, pp.36-68.
- Le Manach, S., Sotton, B., Huet, H., Duval, C., Paris, A., Marie, A., Yépreman, C., Catherine, A., Mathéron, L., Vinh, J., Edery, M. y Marie, B., 2018. Physiological effects caused by microcystin-producing and non-microcystin producing *Microcystis aeruginosa* on medaka fish: a proteomic and metabolomic study on liver. En: *Environmental Pollution*, 234, pp.523-537. doi: 10.1016/j.envpol.2017.11.011.

- Li, X.Y., Chung, I.K., Kim, J.I. y Lee, J.A., 2004. Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to *Microcystis* under laboratory conditions. En: *Toxicon*, 44(8), pp.821-827. doi: 10.1016/j.toxicon.2004.06.010.
- Li, L. y Xie, P., 2009. Hepatic histopathological characteristics and antioxidant responses of phytoplanktivorous silver carp intraperitoneally injected with extracted microcystins. En: *Biomedical and Environmental Sciences*, 22, pp.297-302.
- Li, W., Xie, P., Chen, J., He, J., Guo, X., Yu, D. y Chen, L., 2014. Quantitative liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of microcystin-RR and its glutathione and cysteine conjugates in fish plasma and bile. En: *Journal of Chromatography B*, 963, pp.113-118. doi: 10.1016/j.jchromb.2014.05.057.
- Meriluoto, J., Spoof, L. y Codd, G.A., eds., 2017. *Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis*. Londres: John Wiley & Sons.
- Niedermeyer, T., Prinsep, M.R., Wood, S.A., Kaufononga, S.A.F., Cary, S.C. y Hamilton, D.P., 2014. High levels structural diversity observed in microcystins from *Microcystis* CAWBG11 and characterization of six new microcystin congeners. En: *Marine Drugs*, 12, pp.5372–5395.
- Pérez-Schirmer, M., Gonzalez-Sapienza, G., Sienra, D., Ferrari, G., Last, M., Last, J.A. y Brena, B.M., 2013. Limited analytical capacity for cyanotoxins in developing countries may hide serious environmental health problems: Simple and affordable methods maybe the answer. En: *Journal of Environmental Management*, 114, pp. 63-71.
- Pérez-Schirmer, M., Rossotti, M.A., Badagian, N., Leizagoyen, C., Brena, B.M. y Gonzalez-Sapienza, G.G., 2017. Comparison of three anti-hapten VHH selection strategies for the development of highly sensitive immunoassays for microcystins. En: *Analytical Chemistry*, 89(12), pp.6800-6806.
- Pérez-Schirmer, M., Brena, B.M. y González-Sapienza, G., 2019. Oriented functionalization of magnetic beads with in vivo biotinylated nanobodies for rapid MALDI-TOFMS. Ultrasensitive quantitation of microcystins in biological samples. En: *Analytical Chemistry*, 91(15), pp.9925-9993.
- Poste, A.E., Hecky, R.E. y Guildford, S.J., 2011. Evaluating microcystin exposure risk through fish consumption. En: *Environmental Science and Technology*, 45, pp. 5806–5811. doi:10.1021/es200285c.

- Preeti, T., Hariharan, G. y Rajarajeswari, G.R., 2016. Histopathological and biochemical effects of cyanobacterial cells containing microcystin-LR on *Tilapia* fish. En: *Water and Environment Journal*, 30(1-2), pp.135-142. doi:10.1111/wej.12169.
- Prieto, A., Atencio, L., Puerto, M., Pichardo, S., Moreno, I. y Cameán, A., 2008. Efectos tóxicos producidos por las microcistinas en peces. En: *Toxicology*, 25, pp.22-31.
- Qi, Y., Rosso, L., Sedan, D., Giannuzzi, L., Andrinolo, D. y Volmer, D.A., 2015. Seven new microcystin variants discovered from native *Microcystis aeruginosa* strain -unambiguous assignment of product ions by tandem mass spectrometry. En: *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 29, pp.220-224.
- Roegner, A., Truong, L., Weirich, C., Pérez-Schirmer, M., Brena, B., Miller, T.R. y Tanguay, R., 2019. Combined *Danio rerio* embryo morbidity, mortality and photomotor response assay: a tool for developmental risk assessment from chronic cyanoHAB exposure. En: *Science of The Total Environment*, 697. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.134210
- Schmidt, J.R., Wilhelm, S.W. y Boyer, G.L., 2014. The fate of Microcystins in the environment and challenges for monitoring. En: *Toxins*, 6, pp.3354-3387. doi:10.3390/toxins6123354
- Spoof, L. y Catherine, A., 2017. Tables of microcystins and nodularins. En: Meriluoto, J., Spoof, L. y Codd, G.A., eds. *Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis*. Londres: John Wiley & Sons. Appendix 3, pp.541-552.
- Svirčev, Z., Drobac, D., Tokodi, N., Mijović, B., Codd, G. A., Meriluoto, J., 2017. Toxicology of microcystins with reference to cases of human intoxications and epidemiological investigations of exposures to cyanobacteria and cyanotoxins. En: *Archives of Toxicology*, 91(2), pp.621-650. doi:10.1007/s00204-016-1921-6.
- Svirčev, Z., Lalić, D., Bojadžija Savić, G., Tokodi N., Drobac Backović D., Chen L., Meriluoto J. y Codd GA., 2019. Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings. En: *Archives of Toxicology*, 93, pp.2429-2481. DOI:10.1007/s00204-019-02524-4.
- UNESCO, 2009. *Cianobacterias Planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión*. Montevideo: UNESCO. (Documento Técnico PHI-LAC, 16). ISBN 978-92-9089-138-3.
- Uruguay, Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, 2019. *Iniciativa para el Rio Negro* [En línea]. Montevideo: DINAMA [Consulta: 14 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://www.mvotma.gub.uy/novedades/noticias/item/10012209-iniciativa-para-el-rio-negro>

Zaffiro, A., Rosenblum, L. y Wendelken, S.C., 2016. Method 546: *Determination of total microcystins and nodularins in drinking water and ambient water by adda enzyme-linked immunosorbent assay* [En línea]. Cincinnati: USEPA. [Consulta: 6 de Abril de 2018] Disponible en: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/method-546-determination-total-microcystins-nodularins-drinking-water-ambient-water-adda-enzyme-linked-immunosorbent-assay.pdf>

Zanchett, G. y Oliveira-Filho, E.C., 2013. Cyanobacteria and Cyanotoxins: from impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects. En: *Toxins*, 5, pp.1896-1917.

Water flow and temperature as main factors that regulate phytoplankton and cyanobacterial blooms in a large subtropical river

El caudal y la temperatura del agua son los principales factores que regulan el fitoplancton y las floraciones de cianobacterias en un gran río subtropical

O caudal e a temperatura da água são os principais fatores que regulam o fitoplâncton e as florações de cianobactérias em um grande rio subtropical

RECIBIDO: 20/4/2020 → APROBADO: 17/6/2020 ✉ gferrari@latu.org.uy

✉ FERRARI, GRACIELA (1)

(1) DEPARTAMENTO DE CALIDAD DE AGUA Y EVALUACIÓN AMBIENTAL DEL LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY, LATU. MONTEVIDEO, URUGUAY.

ABSTRACT

Seasonal variations and interannual changes (2006-2019) of the phytoplankton community, related to variations in water quality and river discharge, in the lower part of the Uruguay River in South America are presented. In total, 422 microalgae and cyanobacterial taxa were identified. Cryptophytes, cyanobacteria, and diatoms were the predominant groups. Although nanoflagellates and cryptophytes were always present in plankton, statistical differences were found in seasonal assemblages of phytoplankton. According to the similarity analysis SIMPER, the typical species for each season were identified: *Aulacoseira* spp. in winter, *Dolichospermum uruguayense*, *Durinskia baltica* and *Ankistrodesmus arcuatus* in spring, *Microcystis aeruginosa*, *M. wesenbergii*, *Dolichospermum uruguayense* and *D. circinale* in summer and *Ceratium* cf. *furcoides*, *A. arcuatus*, *Raphidiopsis* and *Jaaginema* sp. in autumn. Under lentic river conditions ($2000 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) and above 22 °C, high biomass was recorded due to the blooms of *Microcystis* and *Dolichospermum*. In 2010, *M. panniformis* reached 10.4 $\mu\text{g l}^{-1}$ microcystin-LR. *Raphidiopsis mediterranea* and *R. raciborskii* began to be registered in spring (2009 and 2014 respectively) reaching 1041 cell ml^{-1} in spring 2017. This paper shows that flow, transparency and temperature are the main factors that regulate phytoplankton biomass and cyanobacterial blooms in the Uruguay River. In the summer, when the Uruguay

River is in low flow conditions, cyanobacteria remain in the river. When flow increases, cyanobacteria are transported downstream and could reach the estuary of the Río de la Plata, impacting its beaches.

KEY WORDS: harmful algal blooms, large rivers, Río de la Plata, diversity.

RESUMEN

Se presentan las variaciones estacionales y los cambios interanuales (2006-2019) de la comunidad de fitoplancton, relacionados con las variaciones en la calidad del agua y la descarga del río, en la parte inferior del río Uruguay, en América del Sur. En total, se identificaron 422 taxones de microalgas y cianobacterias; cryptomonas, cianobacterias y diatomeas fueron los grupos predominantes. Aunque los nanoflagelados y las cryptomonas estuvieron siempre presentes en el plancton, se encontraron diferencias estadísticas en los ensambles estacionales del fitoplancton. Según el análisis de similitud SIMPER, fueron identificadas las especies típicas para cada estación. Para el invierno, *Aulacoseira* spp.; para la primavera, *Dolichospermum uruguayense*, *Durinskia baltica* y *Ankistrodesmus arcuatus*; para el verano, *Microcystis aeruginosa*, *M. wesenbergii*, *Dolichospermum uruguayense* y *D. circinale*; y para el otoño, *Ceratium* cf. *furcoides*, *A. arcuatus*, *Raphidiopsis* y *Jaaginema* sp. En condiciones lénticas del río (<2000 m³ s⁻¹) y por encima de los 22 °C se registraron altas biomásas debido a las floraciones de *Microcystis* y *Dolichospermum*. En 2010, *M. panniformis* alcanzó los 10.4 µg l⁻¹ de microcistina-LR. *Raphidiopsis mediterranea* y *R. raciborskii* comenzaron a registrarse en la primavera de 2009 y de 2014, respectivamente, alcanzando las 1041 cel ml⁻¹ en la primavera de 2017. Los principales factores que regulan la biomasa del fitoplancton son el caudal, la transparencia y la temperatura. En verano, cuando el río Uruguay se encuentra en bajas condiciones de caudal, las cianobacterias permanecen en el río. Si el caudal aumenta, son transportadas aguas abajo, pudiendo alcanzar el estuario del Río de la Plata, afectando sus playas.

PALABRAS CLAVE: floraciones de algas nocivas, grandes ríos, Río de la Plata, diversidad.

RESUMO

São apresentadas as variações estacionais e as mudanças interanuais (2006-2019) da comunidade de fitoplâncton, relacionadas com as variações na qualidade da água e a descarga do rio, na parte inferior do Rio Uruguay, na América do Sul. No total, foram identificados 422 táxons de microalgas e cianobactérias. Cryptomonas, cianobactérias e diatoméias foram os grupos predominantes. Embora os nanoflagelados e crytomonas estiveram sempre presentes no plâncton, foram achadas diferenças estatísticas nas assembleias sazonais do fitoplâncton. Segundo a análise de similitude SIMPER, as espécies típicas para cada estação do ano foram identificadas. Para o inverno, *Aulacoseira* spp.; para a primavera, *Dolichospermum uruguayense*, *Durinskia baltica* e *Ankistrodesmus arcuatus*; para o verão, cianobactérias *Microcystis aeruginosa*, *M. wesenbergii*, *Dolichospermum*

uruguayense e *D. Circinale*; e para o outono, *Ceratium* cf. *furcoides*, *A. arcuatus*, *Raphidiopsis* sp. e *Jaaginema* sp. Nas condições lênticas do rio (<2000 m³ s⁻¹) e por cima dos 22 °C, foram registradas altas biomassas devido às florações de *Microcystis* e *Dolichospermum*. Em 2010, *M. panniformis* alcançou os 10,4 µg l⁻¹ de microcistina-LR. *Raphidiopsis mediterranea* e *R. raciborskii* começaram a ser registradas na primavera de 2009 e 2014, respectivamente, chegando às 1041 cel ml⁻¹ na primavera de 2017. Os principais fatores que regulam a biomassa de fitoplâncton são o caudal, a transparência e a temperatura. No verão, quando o Rio Uruguai tem caudal baixo, as cianobactérias permanecem no rio. Se o caudal do rio aumenta, as cianobactérias são transportadas água abaixo, podendo chegar até o estuário do Rio da Prata, afetando as praias.

PALAVRAS CHAVE: florações de algas nocivas, grandes rios, Rio da Prata, diversidade.

INTRODUCTION

In large rivers, significant autotrophic primary production of phytoplankton is expected and is limited to middle river sections, or to lowland areas of higher-order rivers order presuming favorable conditions for phytoplankton growth (Reynolds and Descy, 1996). In subtropical rivers, the development of phytoplankton biomass is strongly correlated with the concentration of nutrients, turbidity or light availability (Basu and Pick, 1995; Dodds, 2006). According to Reynolds (2000), hydrological factors such as discharge and dead zones (areas of high resilience) are the most important factors in the development of the rivers' phytoplankton. In the subtropical region, seasonal changes in the phytoplankton community are related to seasonal changes in temperature (Cloern, et al., 2014).

The Uruguay River is one of the largest rivers in South America (>1,800 km); it belongs to the La Plata Basin, forming the triple border of Brazil, Argentina and Uruguay. One of the main factors affecting the river's water quality was the construction of more than ten hydroelectric dams (i.e. Itá, Machadinho, Itapiranga, Roncador, Garabí, San Pedro, Salto Grande) to meet the growing energy demands which accompanied the region's economic growth, (National Water Agency, ANA, 2005). In Uruguay, the Salto Grande Dam, located 300 km upstream from the mouth of the river, has an important regulatory effect over the discharges above and within the Río de la Plata estuary (EcoMetrix, 2006). Based on historical values (1980-2015), the average annual discharge of the river is 5527 m³ s⁻¹, but in 2017, it reached 7598 m³ s⁻¹ (Salto Grande Mixed Technical Commission, [s.d.]).

Agriculture is an important activity in the Lower Uruguay River Basin with a significant production of citrus fruit and other crops (O'Farrell and Izaguirre, 2014). The most important Uruguayan city in the area studied is Fray Bentos, which is also an active port. This lower section of the Uruguay river gained importance after the installation of a pulp mill in 2006, and the subsequent start of its operations in November 2007 (Uruguayan Technological Laboratory, LATU, 2019). Periodical reports on navigation, cyanobacterial blooms and fisheries surveys are published locally by the Salto Grande Mixed Technical Commission

and the Uruguay River Administrative Commission (CARU, [s.d.]). In addition to this, binational monitoring in the pulp mill's area of influence has been carried out since 2012 and along the binational Argentina-Uruguay section since 2018. CARU surveys the state of the river through water, sediment and biota samples monitoring on both sides of the river and in the center of the channel showing the acceptable limits. Thirteen water quality parameters measured showed concentration values above the limits established in CARU's Standard for 179 variables. Parameters that systematically exceed CARU Digest levels are Iron, Oils and Fats, and Total Phenolic Substances (CARU, [s.d.]).

Although several authors have conducted phytoplankton studies in the Uruguay river basin (de Díaz, 1961; et al, 1986; O'Farrell, 1994; O'Farrell and Izaguirre, 1994; Bonilla, 1997; Pérez, et al., 1999; Pérez, 2002), most of the existing studies on the Uruguay River were focused on the Salto Grande dam (Quirós and Luchini, 1982; De León and Chalar, 2003; Chalar, 2006, 2009; O'Farrell, et al., 2012; Chalar, et al., 2002, 2017;) since 1979, when the lake reservoir was formed. Little research has been done on the topic of phytoplankton composition and ecology in its lower part. O'Farrell and Izaguirre, (1994), showed a gradient along the Argentinean banks and the Uruguay River's tributaries during 1986-1987 where the potamoplankton was dominated by nanoflagellates, cryptophytes and *Aulacoseira* genus. They found that the seasonal succession of phytoplankton diversity was mainly regulated by temperature, transparency and water discharge, with turbidity showing up as a limiting factor for algae development during summer's low water periods, but a correspondence analysis was not performed. Many other reports focused on cyanobacterial blooms. Ferrari and others (2011) reports two possible scenarios which could account for the dynamics of cyanobacterial blooms in the Lower Uruguay River. The first one is that in high flow conditions, the bloom is concentrated in the dam and reaches the open waters of the Río de la Plata estuary as a result of rainfall, or because of the management of the Salto Grande dam. During the summer, when low flow conditions (lentic conditions) are present, the bloom is concentrated locally by a stable high water column. A marked gradient was observed in the meteorological, physical, and chemical parameters of the plankton assemblages from Salto Grande to Punta del Este, in a comprehensive monitoring during 2013-2014, along the Uruguay River's banks and the Río de la Plata coastline (Kruk, et al., 2015). In the sampling from both summers (2013 and 2014), a *Microcystis* bloom was registered in the Salto Grande dam. An exceptional bloom observed in the summer of 2019 reached Uruguay's Atlantic ocean coast. This event occurred under extreme precipitation conditions that induced high water flows, which transported cyanobacterial blooms downstream (Kruk, et al., 2019). Recently, a synoptic study showed the relevance of temperature and precipitation on the distribution of cyanobacteria, comparing lentic and lotic freshwaters in the country (Haakonsson, et al., 2017). The study found that the filamentous *Dolichospermum* was the most widely distributed and the most frequent genus in the region surveyed.

The aim of this study was to identify the main factors that produce seasonal changes in the phytoplankton community of the lower Uruguay River, as well as its relationship with water quality. This work is based on the data compiled over a fourteen-year period (2006 to 2019). We reported on the composition, abundance, carbon biomass of microalgae and cyanobacteria and water quality variables.

MATERIAL AND METHODS

Study area

Uruguay belongs to a subtropical climate zone (Kottek, et al., 2006) characterized by hot and humid summers and generally mild winters with the following features: mild moderate rain (1000-1600mm annual average between 1961-1991), humid subtropical climate (*Cfa* type) (INUMET, [s.d.]) and annual average temperature of 17.5 °C with temperatures above 22 °C in the warmest months. During the study period (2006-2019) the average values of air temperature were 17.9 °C with precipitation values of 1207 mm, (data provided by UPM weather station).

The study area comprises three sites along the lower part of the Uruguay River: an upstream site located in Nuevo Berlín (NB), a central site in Fray Bentos (FB) and a downstream site at Las Cañas (LC). A long-term (2006-2019) seasonal sampling was carried out at the three sites. In each site, three samples were taken covering littoral, center and channel zones of the Uruguayan section of the river (Figure 1). The NB site is located between natural channels and islands. The central site, FB, is located close to the international bridge and the city of Fray Bentos, which is also an active port. In the downstream site at LC, the river becomes wider, forming an extensive plain with sandy beaches that attract a significant number of tourists during summertime.

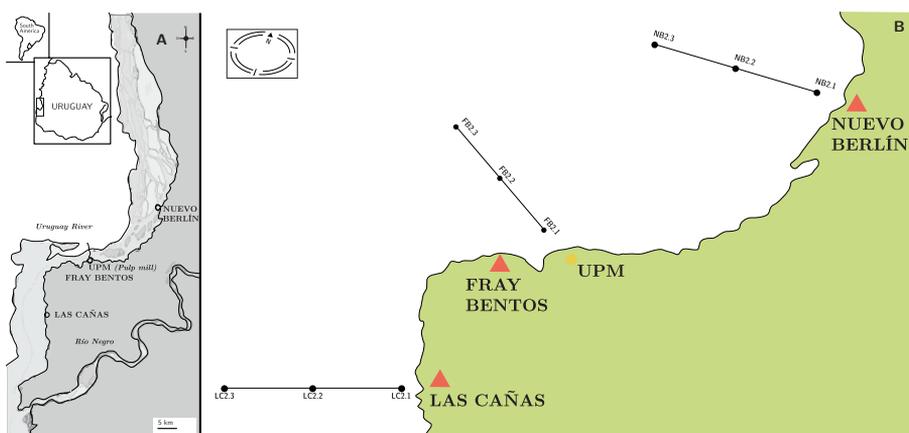


Figure 1. A) Study area of the Uruguay River and sampling sites from upstream to downstream: Nuevo Berlín (NB), Fray Bentos (FB) and Las Cañas (LC) (black-white circles). B) Sampling design.

Samplings and analysis

Fourteen seasonal sampling surveys (summer: February, autumn: May, winter: August and spring: November) on three sites with a transect with three points (littoral, center and channel) were carried out during July 2006 to November 2019, with a total of 486 sampled points (Figure 1). Conductivity, temperature, oxygen and pH were measured *in situ* with a YSI 6600 V2 sensor and the transparency was estimated with a Secchi disc. Water samples were taken directly for nutrients and chlorophyll analyses, using standard methods as described in detail by Ferrari and others (2011), Tana and others (2013), Uruguayan Technological Laboratory, LATU (2016, 2017, 2018, 2019). Discharge at the Salto Grande dam displays considerable variability related to regional and global processes, with high discharges during El Niño events in phase with El Niño Southern Oscillation (ENSO) due to heavy rainfall (Colombo, et al., 2015). The opening and closing of the floodgates is the main influence on the flow of the river, since in this lower section there is no significant contribution from tributaries that could modify its flow rate. The daily average of the Salto Grande dam discharge was obtained for the period of study from the river's binational monitoring entity (Salto Grande Mixed Technical Commission, [s.d.]). The total nitrogen and total phosphorus were used to calculate N:P atomic ratios. The monthly geometric mean total phosphorus concentration following IET $(PT) = 10^{(6 - ((0,42 - 0,36 * (\ln PT)) / \ln 2))} - 20$ was used to determine the Uruguay River's trophic status (Lamparelli, 2004). Subsurface phytoplankton samples were collected with bottles and fixed *in situ* with Lugol's solution for quantification, and net samples were collected and fixed with formaldehyde (4%) for taxonomical studies (Sournia, 1978). When cyanobacterial blooms occurred, cyanobacteria samples were gathered for microcystin-LR analysis were taken using HPLC, according to the ISO 20179 (International Organization for Standardization, 2005). During the sampling period, three extra samplings were carried out in the summer of 2009 and the spring of 2010, as a result of a cyanobacterial bloom warning in the area near the Fray Bentos site.

The sedimentation method based on Utermöhl (1958), was used to identify and quantify phytoplankton. Half or the entire chamber was screened under low magnification (100 or 200x) for organisms >50 µm, while smaller organisms were counted under 400x magnification according to cell density in each sample. Phytoplankton organisms were identified at the lowest possible taxonomic level and divided into groups or Classes. For cyanobacteria, the most recent taxonomical classification presented by Komárek and others (2014) was used. Determinations were made following Komárek and Anagnostidis (2008a, 2008b) and Komárek (2013). To identify some diatoms, the oxidation technique was followed (Battarbee, 1986). Counts included at least 100 cells of the most abundant species, in order to achieve a confidence interval of 95% (Lund, et al., 1958). In the case of *Microcystis* spp. blooms, the methodology followed Box (1981), counting the number of cells per ml in a gridded Sedgewick-Rafter counting chamber. Biovolume was estimated from mean cell dimensions and shape based on Hillebrand and others (1999). The cell biovolume was transformed to biomass as cell carbon (pgC cel⁻¹), according to Menden-Deuer and Lessard (2000). Biovolume was multiplied by the density (cell

ml⁻¹) to estimate phytoplankton carbon biomass (ngC ml⁻¹). Picoplankton cells (<2 µm) were not counted because this requires a special methodology.

Exploratory analyses were performed to identify major patterns and define final tests. In order to evaluate spatial (site and zone) differences among samplings, analyses of similarities ANOSIM were performed with phytoplankton and environmental matrixes. The carbon biomass of the main phytoplankton groups (Cyanobacteria, Chlorophyta, Bacillariophyta, Cryptophyta and “other”) were logarithmically transformed and similarity matrices were constructed with the Bray-Curtis index. ANOSIM results showed significant temporal differences between sampling surveys regarding biomass matrix (RGlobal = 0.544), meanwhile no significant spatial differences were found in either sites (RGlobal = 0.011, p>0.001) or in zones, (RGlobal = 0.016, p>0.001). The same results were found with environmental matrixes, (RGlobal temporal = 0.876, p> 0.001) with no differences either per sites (RGlobal sites = -0.016, p>0.001) or per zones (RGlobal zones = 0.017, p=0.001). In addition, the analysis of variance ANOVA showed no significant differences either between the three sites (NB, FB and LC) or between zones (littoral, center and channel) for phytoplankton density $F_{(4, 477)} = 0.79$, p = 0.52, biomass $F_{(4, 477)} = 0.92$, p = 0.45, richness $F_{(4, 477)} = 0.16$, p = 0.95 and Shannon diversity index $F_{(4, 477)} = 1.21$, p = 0.30. Those analyses enable the use of monthly averages. For those analyses, environmental variables were used: (nitrates (NO₃ mgL⁻¹), total nitrogen (TN mgL⁻¹), nitrate (NO₃ mgL⁻¹), total phosphorus (TP µgL⁻¹), soluble reactive phosphorus (PO₄ µgL⁻¹), chlorophyll *a* (Chl *a* µgL⁻¹), Secchi disk (SD cm), conductivity (mS cm⁻¹K), temperature (T °C), pH and discharge (Qm³s⁻¹), were normalized and Euclidean indexes were used for the similarity matrix. Flow data of the sampling dates were used to perform the analysis.

To evaluate the role of each species and its contribution to the season, the coefficients of similarity between samples and the average similarity / dissimilarity between all the pairs of samples in each group was calculated, applying the similarity percentages breakdown (SIMPER) using the PRIMER routine (Clarke and Warwick, 2001). This analysis identifies the species that are mostly responsible for the observed patterns. Species that contributed the most to the similarity within a season were considered typifying. The species that contributed the most to the dissimilarity within a group, were considered discriminates between groups (Clarke, 1993, Clarke and Gorley, 2006). For the SIMPER analysis, the biomass matrix was used. The small Cryptophytes heterotrophic organisms were not considered for this analysis. A one way ANOSIM was performed to analyze differences between seasons.

For the environmental matrix, Spearman's correlation coefficient was used. Bubble biplots were used to highlight the relationship between flow and temperature in phytoplankton biomass. For XY graph, Cryptophytes were not considered. To determine the set of environmental variables which contribute to explain the variability of phytoplankton biomass, we performed a Canonical Correspondence Analysis (CCA) using the unimodal method. This analysis is valid to apply for any size of the environmental gradient (Legendre and Legendre, 2012). A biomass matrix for species with >25% in the total Log₁₀ (x +1) sample was used. The

environmental matrix was normalized and the significance of the contributions from environmental variables with the ordination of species was tested through Monte Carlo permutations test ($p < 0.05$). The significance of canonical correlation coefficients of each environmental variable for axes 1 and 2 was evaluated by means of an approximation of t-Student statistic (Ter Braak, 1986). A Multivariate Statistical Package (MVSP software) was used.

RESULTS

Environmental variables

Surface water temperature varied seasonally between 11.5 °C in winter and 28.8 °C in summer. Conductivity showed low variation (32-279 $\mu\text{S cm}^{-1}$) throughout the period. pH did not show a wide range of variation (6.1-9.5); the Secchi disc values ranged between 0.20 and 1.60 m and the turbidity reached 78 NTU (Table 1).

Table 1. Seasonal average and maximum-minimum during 2006-2019. Average and standard deviation of nutrients and *in situ* parameters for each season. nd: Not determined.

SEASON	Total Nitrogen (mg l ⁻¹)	Total Phosphorus (µg l ⁻¹)	Nitrate (mg l ⁻¹)	Soluble Phosphorus (µg l ⁻¹)	Chlorophyll (µg l ⁻¹)	Turbidity (NTU)	Secchi Disc (cm)	Temperature (°C)	Conductivity (µS/cm)	pH	Dissolved oxygen (mg l ⁻¹)	River flow (m ³ s ⁻¹)
SUMMER Average	0.9	61.4	0.5	42.0	5.3	19.6	60.9	26.4	67.9	7.4	7.5	4525
stdev	0.2	45.1	0.2	30.9	18.9	7.4	19.2	1.1	11.7	0.4	0.7	2893
AUTOMN Average	1.1	73.3	0.6	34.0	1.4	25.4	61.2	18.4	69.2	7.2	8.5	11698
stdev	0.7	42.1	0.3	23.1	4.4	13.1	32.6	1.5	17.5	0.4	1.4	14073
WINTER Average	1.3	89.2	0.8	24.8	0.6	27.0	45.7	14.5	64.4	7.3	9.5	7296
stdev	0.2	95.5	0.3	19.1	0.8	11.0	13.4	1.5	13.4	0.4	0.9	4461
SPRING Average	1.1	83.9	0.7	23.6	1.6	29.9	48.3	23.3	73.2	7.2	7.9	11365
stdev	0.3	123.8	0.2	18.5	2.8	11.6	12.1	2.8	48.9	0.7	1.6	8325
Annual average	1.1	77.2	0.6	30.8	2.2	25.4	53.8	20.6	68.7	7.3	8.4	8744
minimum	0.1	nd	nd	nd	nd	9.0	20.0	11.6	32.4	6.1	2.3	522
maximum	6.8	1340.0	1.7	163.0	185.0	78.0	160.0	28.8	279.0	9.5	13.0	56070

Nutrient fluctuation at the three sites was similar, with an increase in total nitrogen at NB (in winter), while soluble phosphorus showed three peaks in autumn 2007, 2011 (near 100 $\mu\text{g l}^{-1}$). Fluctuations of total phosphorus remained within historical ranges, with the exception of two peaks, one in August 2011 at the three sites, with the highest concentration at FB reaching values of 887 $\mu\text{g l}^{-1}$, and in November 2019 with 1340 $\mu\text{g l}^{-1}$ at FB (Table 1). The general trophic state of the Uruguay River was mesotrophic (52-59), presenting some eutrophic (60-63) sampling in Aug-11, Feb-17, May-19, Nov-19 due to peak of total phosphorus (Figure 2).

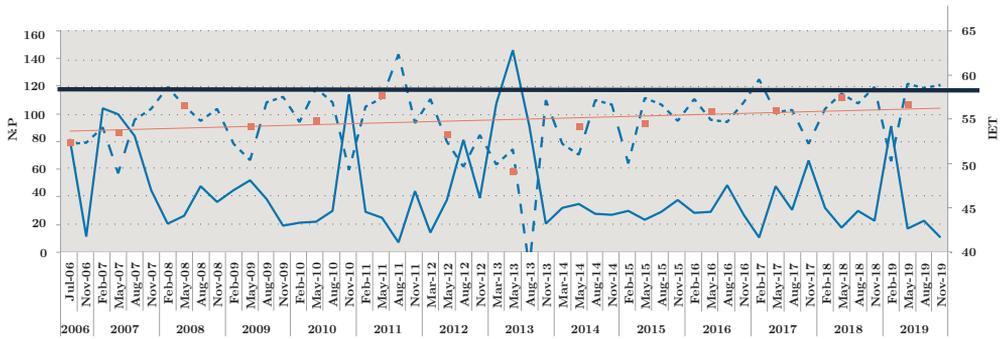


Figure 2. Monthly Redfield ratio N:P (solid line) and monthly trophic status index IET (dotted line) during 2006-2019. Bold solid lines show the limit of 59 for IET. Above, eutrophic state is indicated. Orange squares: annual average and orange line: tendency line.

The atomic Redfield ratio showed no nitrogen limitation condition for phytoplankton growth. Most of the time, the ratio was values above 20, but in Nov-06, Aug-11, Feb-17 and Nov-19, this ratio was below 16 at times when PT concentration was above 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Figure 2).

Phytoplankton diversity biomass and chlorophyll *a*

During the study period, from July 2006 to November 2019, 422 taxa of algae and cyanobacteria were recorded at three selected sites (Annex 1). The phytoplankton groups were: Cyanobacteria, Bacillariophyta, Chlorophyta *s.l.*, Zygnemaphyta, Cryptophyta, Chrysophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Raphidophyta, Xanthophyta, and undetermined flagellates. For the purpose of graphics, an additional group called “Others” composed of Chrysophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Raphidophyta, Xanthophyta and undetermined flagellates were grouped together.

The diatoms presented the highest number of taxa (158), followed by the Chlorophyta *s.l.* with 95 taxa, including 55 green coccal algae, 56 Euglenoids (Annex 1). Cyanobacteria were represented by 49 taxa. From a total of 158 diatoms recorded, 134 taxa belonged to pennates and 24 taxa to centric diatoms. During high flow periods, most of the diatom taxa were tycho plankton. Dinoflagellates were represented with 18 taxa and Cryptophyta and Chrysophyta with 9 taxa each. Raphidophyta was represented with the species *Gonyostomum semen* (Annex 1).

The lowest number of taxa per sample (4) were found in winter 2008 (NB), winter 2009 (LC), spring 2008 (FB and LC) and in autumn 2010 (NB and LC). The highest taxa number per sample (69) was found in summer 2016 and 2013: 52 taxa both NB, followed by 43 taxa in LC and 42 in FB. The genera *Nitzschia* and *Trachelomonas* showed the highest number of species (21 and 17). The diatom *Hydrosera whampoensis* and the cyanobacteria *Jaaginema* sp. and *Microcrocis* sp. were recorded for the first time in Uruguay. The most frequent species, found in more than 30% of the samples were: *Plagioselmis lacustris* (92,6%), *Cryptomonas* cf. *marssonii* (86,6%), *Aulacoseira granulata* (71,6%), *Ankistrodesmus arcuatus* (57,8%), *Aulacoseira granulata* var. *angustissima* (54,5%), *Plagioselmis nannoplantica* (53,5%), *Aulacoseira* cf. *muzzanensis*

(45%), *Cryptomonas* cf. *ovata*, *Cryptomonas* cf. *reflexa* (40%), *Trachelomonas rugulosa* and the centric sp. 1 (30%) that constitute the potamoplankton.

Figure 3 shows phytoplankton carbon biomass variations of the main four groups in each sampling site during the study period. The cryptophytes, cyanobacteria and diatoms were the most representative groups and to a lesser extent, the chlorophytes. The maximum total biomass was 1270 ngC ml⁻¹ in NB (Nov-10). *Dolichospermum uruguayense* was the most abundant cyanobacteria with 6903 cell ml⁻¹ in low flow conditions (1275 m³ s⁻¹) and high temperature (24.4 °C). In the same sampling survey in FB and LC, this species, *D. uruguayense*, was recorded with values of 1414 and 1597 cell ml⁻¹, respectively. In the sampling of spring 2010, high values of the three parameters were recorded in FB (8073 cell ml⁻¹, 126.8 ngC ml⁻¹, 9.2 µg l⁻¹) and in LC (5734 cell ml⁻¹, 132 ngC ml⁻¹, 7.0 µg l⁻¹), although the most abundant species was the cyanobacteria *Pseudanabaena mucicola*. Another high peak of phytoplankton abundance occurred in summer 2008 in NB (9497 cell ml⁻¹, 347 ngC ml⁻¹, 6.8 µg l⁻¹) when the flow was 2861 m³ s⁻¹ and the temperature reached the highest value (28 °C). In this opportunity, the dominant Cyanobacteria was *Microcystis aeruginosa* with 6705 cell ml⁻¹ (Figure 3).

Only three phytoplankton biomass peaks of other groups occurred, almost 130 ngC ml⁻¹ (Aug-08 and 09, Feb-13 in NB) with 99% of Cryptophyta and 126 ngC ml⁻¹ (Feb-15, NB) of Chlorophyta (*Eudorina elegans*). In the summer of 2017 and 2019, the biomass of “other groups” increased through the presence of the dinoflagellates and euglenoids species. Big size species, like *Ceratium* and *Trachelomonas*, contributed to the total biomass (Figure 3).

Extra monitoring samples in the summer due to a cyanobacterial bloom were taken at the Fray Bentos site. In 2006, the highest microcystin-LR was recorded with 2010 µg l⁻¹ in a *M. aeruginosa* bloom. In 2009, the values were 6.2×10⁶ cell ml⁻¹. *M. aeruginosa* represented 90% of the total abundance followed by *D. uruguayense*, *M. wesenbergii* and *D. circinale*. The other case was in spring 2010, when a high concentration of microcystin-LR was recorded at the FB site with 10.4 µg l⁻¹. In this bloom, *M. panniformis* reached 1.66×10⁶ cell ml⁻¹ and *D. uruguayense* was observed with values of 2×10⁵ cell ml⁻¹ at the NB site. Recently, in 2012 in FB Remeros marina, *M. aeruginosa* reached 8.5×10⁶ cell ml⁻¹.

Other potentially toxic species began to be registered in 2009: *Raphidiopsis mediterranea* and *R. raciborskii* in spring of 2014, reaching 1041 cell ml⁻¹ in spring 2017. *Cuspidothrix* sp., *Microcrocis* sp. and *Aphanizomenon gracile* appeared in the summer 2015.

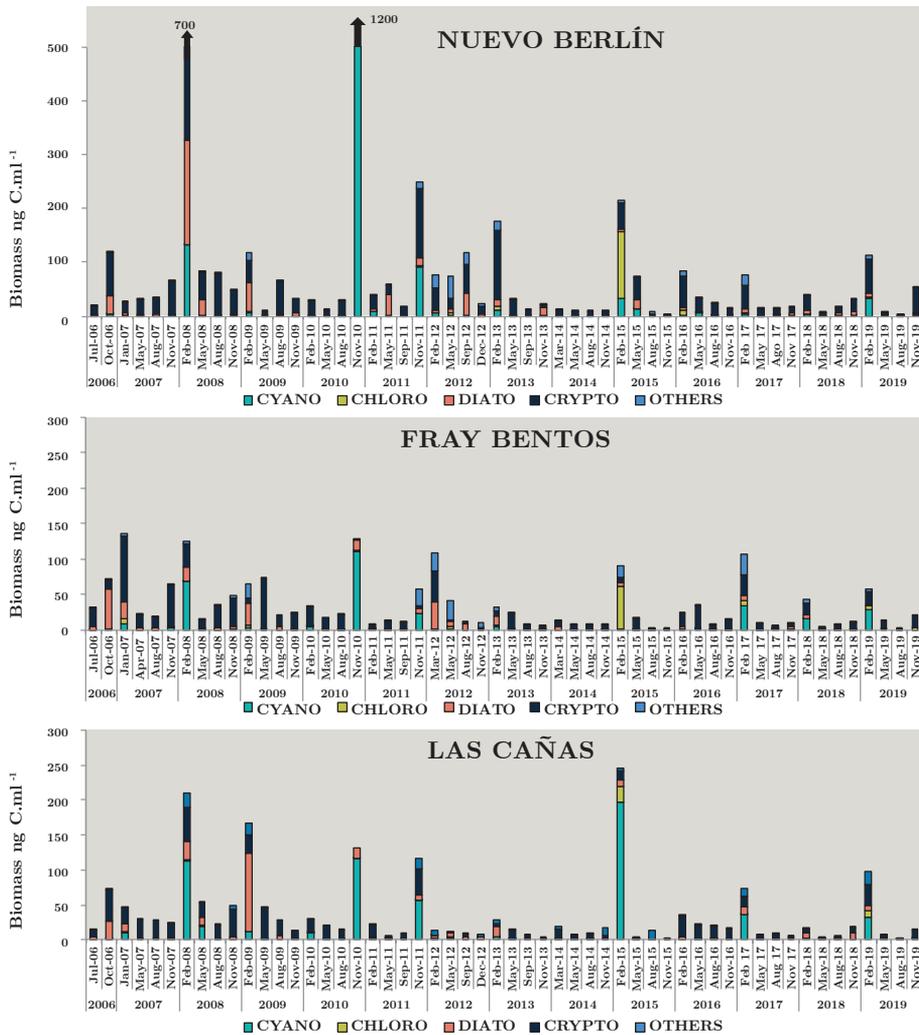


Figure 3. Monthly average carbon biomass (ngC ml^{-1}), for each group: Cyanobacteria (CYANO), Chlorophyta (CHLORO), Bacillariophyta (DIATO), Cryptophyta (CRYPTO) and OTHERS for each sampling between July 2006 and November 2019 on sites: Nuevo Berlín (NB), Fray Bentos (FB) and Las Cañas (LC).

Spearman's correlation coefficient showed high correlation between abundance and carbon biomass ($r = 0.52$) while relatively low with secchi disc ($cc = 0.25$), temperature ($cc = 0.26$) and flow (-0.16). Bubble biplots are used to highlight the relationship between flow and temperature in phytoplankton biomass. The diagram shows that the highest biomass was recorded at the highest temperatures and with flow rates of less than $2000 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ (Figure 4).

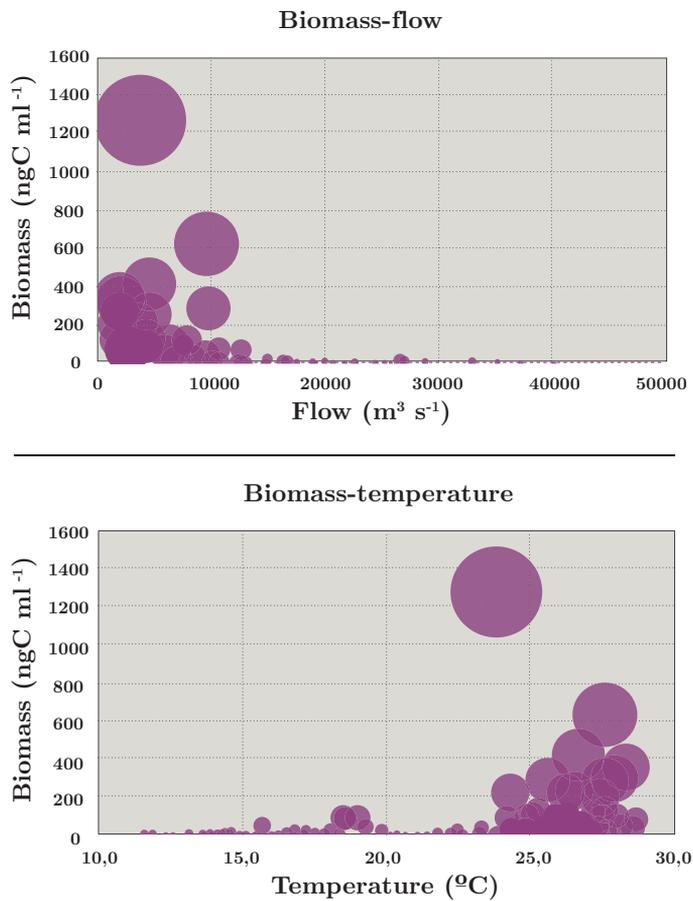


Figure 4. Increasing bubble diagram showing total biomass (ng C ml⁻¹) with regards to flow (m³ s⁻¹) and temperature (°C) during July 2006 - November 2019.

Tables 2 and 3 show the SIMPER analysis carried out with carbon biomass values. *A. granulata* was present in all seasons throughout the sampling period. The typifying species for each season were: *Aulacoseira* spp. in winter, *Dolichospermum uruguayense*, *Durinskia baltica* and *Ankistrodesmus arcuatus* for spring, the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *M. wesenbergi* and *Dolichospermum uruguayense* and *D. circinale* in summer, and *Ceratium* cf. *furcoides*, *A. arcuatus*, *Raphidiopsis* and *Jaginema* sp. in autumn. (Table 2). The discriminant species for winter-spring were *Dolichospermum uruguayense* and *Ceratium* cf. *furcoides*, for summer-winter, *M. aeruginosa* and *Ceratium* cf. *furcoides* and for summer-autumn, *D. uruguayense* and *C. furcoides* (Table 3). There were significant differences between seasons (ANOSIM, Global R: 0.085; p = 0.001) (Table 4).

Table 2. Summary of SIMPER results. Species contributions in each season. Average similarity (Av. Sim.) of typifying species in each season, their contribution (%) to the within-group similarity, and cumulative total (%) of contributions.

Species WINTER Average similarity: 13.13			
	Av.Sim.	Contribution%	Cumulative total%
<i>Aulacoseira granulata</i>	7.0	53.0	53.0
<i>A. granulata</i> var. <i>angustissima</i>	2.0	15.2	68.2
<i>Aulacoseira</i> cf. <i>muzzanensis</i>	0.7	5.3	73.5
<i>Ceratium furcoides</i>	0.5	4.0	77.5
<i>Ankistrodesmus arcuatus</i>	0.4	3.0	80.5
<i>Trachelomonas rugulosa</i>	0.4	2.8	83.3
Species SPRING Average similarity: 15.19			
	Av.Sim	Contribution%	Cumulative total%
<i>Aulacoseira granulata</i>	7.8	51.3	51.3
<i>A. granulata</i> var. <i>angustissima</i>	1.5	9.8	61.1
<i>Dolichospermum uruguayense</i>	1.3	8.5	69.7
<i>Durinskia baltica</i>	1.1	7.0	76.7
<i>Ankistrodesmus arcuatus</i>	0.6	3.8	80.4
<i>Aulacoseira italica</i>	0.5	3.6	84.0
<i>Aulacoseira muzzanensis</i>	0.4	2.9	86.9
Species SUMMER Average similarity: 20.45			
	Av.Sim	Contribution%	Cumulative total%
<i>Aulacoseira granulata</i>	7.3	35.8	35.8
<i>Aulacoseira granulata</i> var. <i>angustissima</i>	5.2	25.4	61.1
<i>Microcystis aeruginosa</i>	1.1	5.2	66.4
<i>Dolichospermum uruguayense</i>	0.8	4.1	70.5
<i>Microcystis wesenbergii</i>	0.8	4.0	74.5
<i>Dolichospermum circinale</i>	0.8	4.0	78.4
Species AUTUMN Average similarity: 10.17			
	Av.Sim	Contribution%	Cumulative total%
<i>Aulacoseira granulata</i>	4.5	43.8	43.8
<i>Ceratium</i> cf. <i>furcoides</i>	1.3	12.3	56.1
<i>Aulacoseira granulata</i> var. <i>angustissima</i>	1.1	11.1	67.2
<i>Ankistrodesmus arcuatus</i>	0.7	6.6	73.7
<i>Aulacoseira</i> cf. <i>muzzanensis</i>	0.5	4.8	78.5
<i>Trachelomonas rugulosa</i>	0.4	3.7	82.2
<i>Raphidiopsis</i> sp.	0.4	3.5	85.8
<i>Jaaginema</i> sp.	0.3	3.1	88.8

Table 3. Average Dissimilarity percentages (Av. Diss) and species contributions (%) in each season. Discriminant species by group determined by SIMPER analysis with biomass matrix.

Groups WINTER & SPRING	Av. Diss	Contributions%
Average dissimilarity = 87.53		
<i>Aulacoseira granulata</i>	10.1	11.6
<i>A. granulata</i> var. <i>angustissima</i>	5.2	17.5
<i>Dolichospermum uruguayense</i>	4.5	22.6
<i>Ceratium</i> cf. <i>furcoides</i>	3.8	27.0
<i>Peridinium</i> sp. 1	3.7	31.2
Groups WINTER & SUMMER	Av. Diss	Contributions%
Average dissimilarity = 87.05		
<i>Aulacoseira granulata</i>	7.7	8.9
<i>A. granulata</i> var. <i>angustissima</i>	6.9	16.9
<i>Microcystis aeruginosa</i>	3.5	20.9
<i>Ceratium</i> cf. <i>furcoides</i>	3.2	24.5
<i>Dolichospermum uruguayense</i>	3.0	28.0
Groups SPRING & SUMMER	Av. Diss	Contributions%
Average dissimilarity = 85.16		
<i>Aulacoseira granulata</i>	7.1	8.3
<i>A. granulata</i> var. <i>angustissima</i>	6.0	15.3
<i>Dolichospermum uruguayense</i>	5.0	21.2
<i>Microcystis aeruginosa</i>	3.3	25.0
<i>Durinskia baltica</i>	3.1	28.6
Groups WINTER & AUTUMN	Av. Diss	Contributions%
Average dissimilarity = 89.43		
<i>Aulacoseira granulata</i>	12.0	13.4
<i>A. granulata</i> var. <i>angustissima</i>	6.7	20.9
<i>Ceratium</i> cf. <i>furcoides</i>	6.2	27.8
<i>Jaaginema</i> sp.	2.8	30.9
<i>Aulacoseira</i> cf. <i>muzzanensis</i>	2.8	34.0
<i>Trachelomonas rugulosa</i>	2.4	36.7
Groups SPRING & AUTUMN	Av. Diss	Contributions%
Average dissimilarity = 89.73		
<i>Aulacoseira granulata</i>	11.5	12.8
<i>A. granulata</i> var. <i>angustissima</i>	5.0	18.4
<i>Dolichospermum uruguayense</i>	5.0	24.0
<i>Ceratium</i> cf. <i>furcoides</i>	4.8	29.3
<i>Durinskia baltica</i>	4.3	34.2
Groups SUMMER & AUTUMN	Av. Diss	Contributions%
Average dissimilarity = 88.67		
<i>Aulacoseira granulata</i>	8.9	10.1
<i>A. granulata</i> var. <i>angustissima</i>	7.7	18.8
<i>Microcystis aeruginosa</i>	4.2	23.5
<i>Ceratium</i> cf. <i>furcoides</i>	3.7	27.6
<i>Dolichospermum circinale</i>	3.5	31.5
<i>Dolichospermum uruguayense</i>	3.3	35.2
<i>Microcystis wesenbergii</i>	2.9	38.4

Table 4. Analysis of Similarity (ANOSIM) results of biomass matrix for each season. R statistic (Global R) and significance level of sample statistic: $p < 0.001$

Seasons	R	p
Winter – Spring	0.100	0.001
Winter - Summer	0.129	0.001
Winter – Autumn	0.034	0.001
Spring - Summer	0.099	0.001
Spring - Autumn	0.077	0.001
Summer - Autumn	0.151	0.001

Correlation between environmental variables and carbon biomass

Transparency, flow and temperature were the most important variables explaining phytoplankton structure. According to the CCA analysis, 57.7% of the total variance was explained in the first two axes. The variables that contributed to the first axis were flow ($cc = 0.71$), Secchi disc depth (SD $cc = -0.64$) and temperature ($cc = -0.63$) (Figure 5 y Annex 2).

There was a positive correlation between the euglenoids *Lepocinclis caudata*, *Trachelomonas planctonica*, the diatoms *Ulnaria ulna*, the dinoflagellate *Ceratium furcoides* and the cyanobacteria *Jaaginema* and *Raphidiopsis mediterranea* with flow and total phosphorus and nitrogen, while cyanobacteria (*Dolichospermum* cf. *planctonicum*, *D. uruguayense* and *Microcystis* spp.) correlated with temperature, pH, Chl *a* and transparency (SD) (Figure 5).

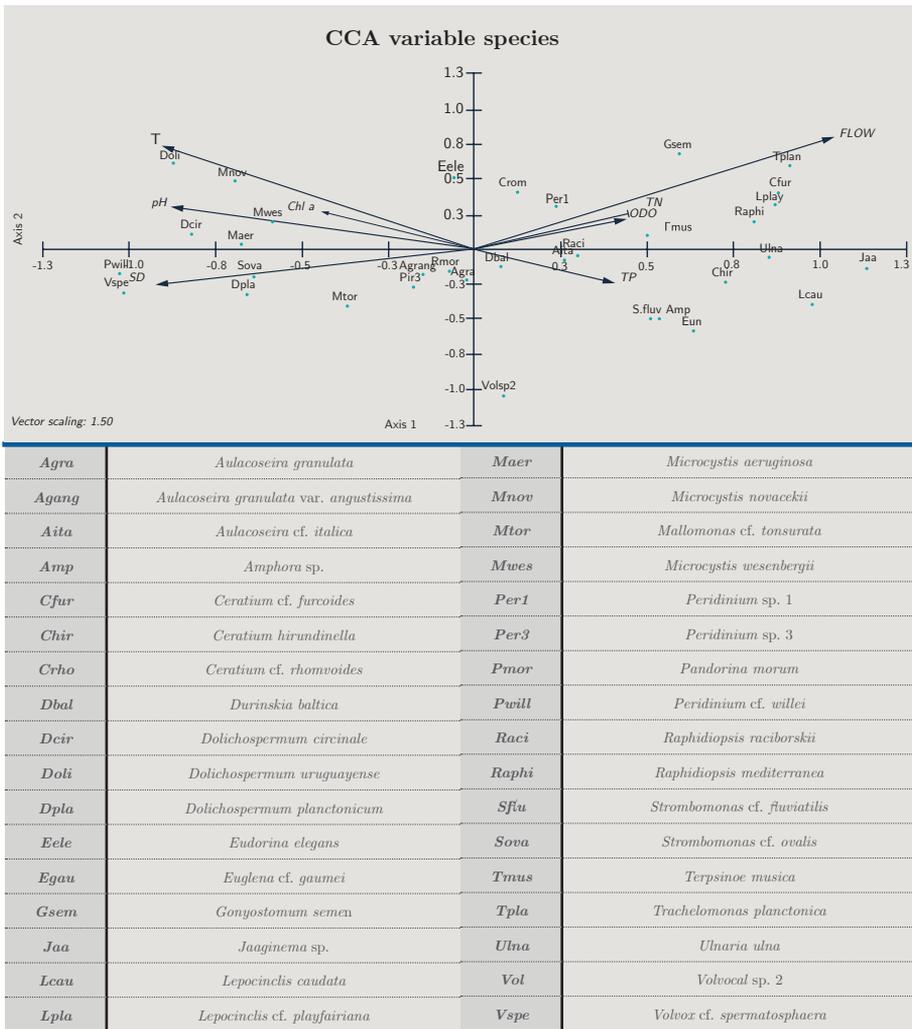


Figure 5. Biplot diagram Canonical Correspondence Analysis for species with biomass over 25%. Cond: conductivity, T: temperature, pH, TN: total nitrogen, TP: total phosphorus, SD: Secchi disc, Chl *a*: chlorophyll *a*, ODO: oxygen and flow. Code of species are presented.

The river flow fluctuated from 2006 to 2019 a minimum of 522 m³.s⁻¹ (February 2008) to a maximum of 56070 m³.s⁻¹ (May 2017) showing several peaks. When flow rate decreased, transparency increased, favoring the development of phytoplankton, increasing the biomass during the summer period (Figure 6).

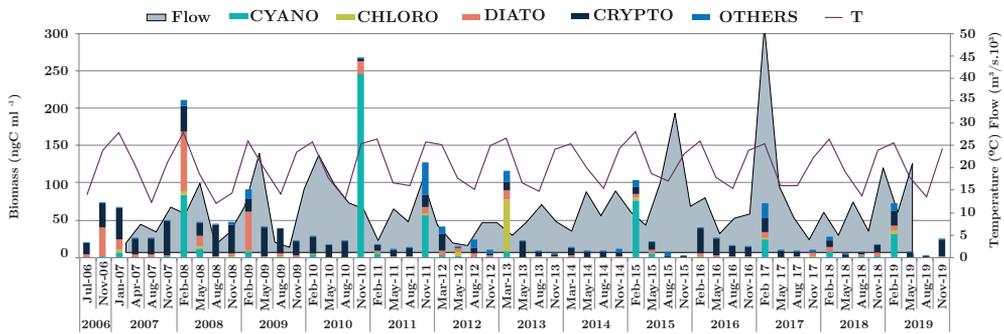


Figure 6. Monthly flow average for the three zones and the three sites ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$) (grey area), phytoplankton biomass groups (ngC ml^{-1}) (bars) and temperature (solid black line), from 2006 to 2019. CYANO: cyanobacteria (green bar), CHLORO: Chlorophyta (dark green bar) DIATO: Bacillariophyta (red bar) CRYPTO: Cryptophyta (black bar) and OTHERS: Chrysophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Raphidophyta, Xanthophyta: Blue bar)

DISCUSSION

After fourteen years of monitoring in the lower Uruguay River, phytoplankton biomass showed a seasonal pattern in which the flow, transparency and temperature were the structuring factors of the phytoplankton community. Potamoplankton is subjected to unidirectional transport, and it is affected by the physical, hydrological and geographical characteristics of the watershed. In the lower Uruguay River, like in any other lotic ecosystem (Giblin, et al., 2010, Zalocar De Domitrovic, et al., 2007, Sabater, et al., 2008), turbulence, associated with flow, has a direct effect on transparency, attenuating the penetration of light. In general, when flow increases, not only do turbulence and suspended solids increase due to erosion, but so do phosphorus and nitrogen levels. In high discharge conditions, the basin bottom is stirred, and resuspended sediments decrease transparency and increase the light extinction coefficient, resulting in decreasing values of phytoplankton biomass (Kirk, 1994). Paraná River, a similar regional river, showed the same behavior with regards to biogeochemical processes and phytoplankton ecology (Bonetto, et al., 1983, O’Farrell, et al., 1996, Zalocar de Domitrovic, et al., 2007, Colombo, et al., 2015, De Cabo, et al., 2003). High densities of phytoplankton at the lower Paraná River during low flow were also recorded, similar to our results for the Uruguay River and to Ferrari and others (2011), O’Farrell and Izaguirre (2014) and Haakonsson and others (2017), have shown that water temperature and rainfall regime may play a key role in the proliferation of cyanobacteria, with precipitation providing indirect meteorological data of the river’s hydrological condition.

Temperature defines the typical seasonal patterns of rivers in the region (O’Farrell and Izaguirre, 2014); Zalocar de Domitrovic, et al., 2007, Soares, et al., 2007). Seasonal changes in phytoplankton community are related to seasonal

changes in temperature, as it happens in other regions (Salmaso, N. and Braioni, 2008, Desortová, B. and Punčochář, 2011). This pattern of seasonal phytoplankton development is generally observed in temperate European rivers, such as in the middle stretch of the Elbe River in Germany, as well as in several rivers in England (Desortová, B. and Punčochář, 2011).

This is the first study that shows this seasonality with different phytoplankton community assemblages. Wehr and Descy (1998) believed that the most successful algal groups in large rivers were Bacillariophyta and Chlorophyta. Prevalence of diatoms and coccal green algae in phytoplankton composition is common for the large temperate rivers in Europe (Desortová, B. and Punčochář, 2011, Sabater et al., 2009, Reynolds and Descy 1996). Dokulil (2014) states that the phytoplankton species composition has always been dominated by diatoms, particularly centric taxa in the Danube River and others, like the Loire River (Descy, et al., 2012) and the lower Ebro River (Pérez, et al., 2009). Montesanto and others (2000), recorded a total of 122 phytoplankton taxa in the lower branches of the Aliakmon river (Greece), where the diatoms were one of the two more important groups. Garnier and others (1995) also reported similar patterns in the River Seine that contained a mixed group comprised of approximately 200 taxa, of which 90 were diatoms and 60 were Chlorophyceae, similar to findings for regional studies in the Paraguay-Paraná Rivers (Zalocar De Domitrovic, 2005), Negro River (Pérez, 2002), and Salado River (O'Farrell, 1993). However, in the Uruguay River, cryptophytes, cyanobacteria and diatoms were the most representative groups, followed by chlorophytes, dinoflagellates and euglenoids. Descy and others (2012) have proved that the presence of a few dominant species accompanied by a large number of sporadic species is the main feature of phytoplankton community structures in large river ecosystems, and similar results have also been reported in many European rivers. The different phytoplankton studies conducted in the Uruguay River have coincided in showing a relatively high species richness (around 200–400 taxa). The phytoplankton community composition and species richness (422 taxa) turned out to be lower than in previous studies in this region of the river, such as during 1986-1987, when 730 taxa were observed (O'Farrell, 1994). This could be due to the fact that most sampling points were on tributaries, not on the Uruguay River itself. The species richness was similar to other regulated rivers in the region, such as the Negro River, with 218 taxa (Pérez, 2002), the Salado River with 291 taxa (O'Farrell, 1993), the Paraná River (García de Emiliani, 1990) and to other tributaries of the Paraná River (García de Emiliani and de Manavella, 1981). Nanoflagellates, *Cryptomonas* spp. and *Aulacoseira* spp. were the most frequent genus throughout the whole period, since they are organisms well adapted to systems with high suspended material content. This was also described by O'Farrell and Izaguirre, (2014), for the potamoplankton of the Uruguay River. *Cryptomonas* are capable of moving through the water column and respond well to conditions of high nutrient content. They can also convert to mixotrophic nutrition during light-limiting conditions. These organisms are very palatable for zooplankton, and their high density makes the system very rich for the next trophic level (Klaveness, 1988).

Total phosphorus concentration in Uruguay's aquatic systems has been shown to be the most critical variable for water quality. The Uruguay River is not a limited nutrient system—it has appeared as mesotrophic with some peaks in total phosphorus, above the current limit set at 25 µg/l, leaning towards eutrophic. Consequently, nutrients would not be a limiting factor for phytoplankton development. According to previous studies upstream, in the Salto Grande reservoir, the main access route of nutrients into the system is also the flow of the Uruguay River (Berón, 1990; Conde, et al., 1996; Chalar, et al., 2017; EcoMetrix, 2006). The lower stretches of the river are a natural receptor for nutrient discharge.

This study showed the presence of 49 Cyanobacteria taxa. Different species of the genera *Dolichospermum* and *Microcystis* were dominant among the bloom-forming species, in agreement with what was reported at the Argentinean banks (O'Farrell, et al., 2014). A new species of *Dolichospermum* was also described: *Dolichospermum uruguayense*, referring to the Uruguay River (Kozlíková-Zapomělová, et al., 2016). Cyanobacterial blooms commonly occur during summer in the lower Uruguay River and they have been reported since 1974 (Quirós and Luchini, 1982; Di Persia, et al., 1986; Berón, 1990; Conde, et al., 1996; Chalar, et al., 2017). *M. aeruginosa* had already been reported in this study area, reaching high concentrations from September 2006 to November 2008 (O'Farrell and Izaguirre, 2014) and its toxin, microcystin, was detected in the Uruguay River on several occasions (Vidal y Britos, 2012; UNESCO, 2009; Bonilla, et al., 2015; Kruk, et al., 2015). Those blooms, together with the Río Negro dam blooms, could be an important source of the Río de la Plata estuary cyanobacterial blooms, affecting the balneability of the coastal zone and its beaches (Sienra and Ferrari, 2006; Kruk, et al., 2019). This work showed a small upward tendency in the IET index over fourteen years. This implies a tendency towards increasing eutrophication and, consequently, more cyanobacterial blooms could be expected in the River. This work also shows that flow and temperature are the main factors that regulate cyanobacterial blooms in the Uruguay River: under low flow conditions, the cyanobacteria remain in the Uruguay River, whereas when flow increases during the summer months, they reach the Río de la Plata estuary, impacting its beaches. According to Haakonsson and others (2017), *Raphidiopsis* and other Nostocales are spreading out their distribution as competitive genera among bloom-forming cyanobacteria in freshwater ecosystems. In a future scenario, complicated by global warming, with predicted increases in temperature and rainfall, this saxitoxin-producing species could have a much higher biomass.

ANNEXES

Annex 1. Species composition showing the current name and occurrence frequency of phytoplankton for each season during 2006-2019. Numbers reflect the frequency of occurrence in each season through the years.

	WINTER	SPRING	SUMMER	AUTUMN
CYANOBACTERIA				
<i>Anabaena</i> sp.	4	2	2	1
<i>Anathece minutissima</i> Komárek et al. 2011	0	0	1	0
<i>Aphanizomenon gracile</i> Lemm	1	0	0	0
<i>Aphanizomenon</i> sp.	0	1	4	0
<i>Aphanotece</i> sp.	0	1	0	0
<i>Coclosphaerium</i> cf. <i>dubium</i> Grun. in Rabenh.	0	0	0	1
<i>Cuspidothrix</i> sp.	4	4	4	1
<i>Dolichospermum circinale</i> (Rabenh. ex Bornet et Flahault) Wacklin et al.	2	12	44	10
<i>Dolichospermum crassum</i> (Lemm.) Wacklin et al.	0	5	5	3
<i>Dolichospermum planctonicum</i> (Brunthaler) Wacklin et al.	1	0	4	2
<i>Dolichospermum spiroides</i> (Kleb.) Wacklin et al.	0	1	0	0
<i>Dolichospermum uruguayense</i> Kozlíková-Zapomělová et al.	1	35	34	3
<i>Dolichospermum viguieri</i> (Denis & Frémy) Wacklin et al.	7	7	15	1
<i>Geitlerinema</i> sp.	0	2	1	0
<i>Geitlerinema splendidum</i> (Grev. ex Gomont) Anagn.	0	0	3	0
<i>Jaaginema</i> sp.	23	10	18	25
<i>Johanseninema constrictum</i> (Szafer) Hasler et al.	0	0	0	1
<i>Komvophoron crassum</i> (Vozzen) Anagn. & Kom.	0	2	1	5
<i>Komvophoron</i> sp.	2	0	3	6
<i>Leptolyngbya</i> sp.	0	0	3	0
<i>Limnothrix</i> sp.	1	0	0	4
<i>Lyngbya</i> sp.	2	2	0	0
<i>Merismopedia glauca</i> (Ehr.) Kütz.	0	1	4	2
<i>Merismopedia</i> sp.	0	0	1	3
<i>Merismopedia tenuissima</i> Lemm.	0	1	1	0
<i>Microcrocis</i> sp.	0	0	1	0
<i>Microcystis aeruginosa</i> (Kütz.) Kütz.	4	10	41	15
<i>Microcystis flos-aquae</i> (Witt.) Kirchn.	0	0	2	0
<i>Microcystis novacekii</i> (Kom.) Comp.	0	2	7	0
<i>Microcystis panniformis</i> Kom. et al.	0	0	1	0
<i>Microcystis</i> sp.	0	6	9	3
<i>Microcystis wesenbergii</i> (Kom.) Kom.	0	0	39	1
<i>Oscillatoria</i> cf. <i>ornata</i> Kütz. ex Gom.	0	1	0	0
<i>Phormidium</i> sp.	3	0	7	2
<i>Planktolyngbya</i> cf. <i>holsatica</i> (Lemm.) Anagn. & Kom.	0	0	0	1
<i>Planktolyngbya limnetica</i> (Lemm.) Komark. & Cronberg	1	0	4	1
<i>Planktothrix isothrix</i> (Skuja) Kom. & Komark.	1	0	3	3
<i>Planktothrix</i> sp.	0	3	4	0
<i>Planktothrix</i> sp. 2	0	1	0	0
<i>Pseudanabaena catenata</i> Lauter.	12	1	10	8

<i>Pseudanabaena moniliformis</i> Kom. & Kling	0	1	0	0
<i>Pseudanabaena mucicola</i> (Naum. & Hub.-Pest.) Schwabe	2	8	19	4
<i>Pseudanabaena</i> sp.	3	6	12	2
<i>Raphidiopsis raciborskii</i> (Wolos.) Aguil. et al.	0	1	9	2
<i>Raphidiopsis curvata</i> Fritsch & Rich	2	1	5	0
<i>Raphidiopsis mediterranea</i> Skuja 1937	10	21	26	29
<i>Snowella lacustris</i> (Chod.) Kom. & Hind.	0	0	1	0
Undetermined cyanobacteria	7	1	0	2
Undetermined oscillatoriales	13	7	6	2
CHLOROPHYCEAE s.l.				
<i>Actinastrum gracillimum</i> G.M. Smith	0	0	0	1
<i>Actinastrum hantzschii</i> Lagerh.	9	11	41	8
<i>Ankistrodesmus arcuatus</i> Kors.	67	79	74	61
<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> Corda	0	1	0	0
<i>Binuclearia lauterbornii</i> (Schm.) Pros.-Lav.	4	1	5	1
<i>Chlamydomonas</i> cf. <i>duplex</i> Skuja	1	1	7	0
<i>Chlamydomonas</i> sp. 1	5	5	8	7
<i>Chlorella</i> sp.	7	3	0	1
<i>Chlorella vulgaris</i> Biej.	2	2	13	7
Undetermined unicellular chlorococcales	1	1	2	0
Undetermined chlorophytes	2	2	0	0
<i>Closteriopsis longissima</i> (Lemm.) Lemm.	9	1	5	12
<i>Coelastrum microporum</i> Näg.	0	3	11	2
<i>Coelastrum pseudomicroporum</i> Kors.	1	0	2	0
<i>Coelastrum</i> sp.	3	1	4	0
<i>Coenochloris fottii</i> (Hindák) Tsarenko	1	0	9	0
<i>Comasiella arcuata</i> var. <i>platydisca</i> (G.M.Smith) E.Heg. & M.Wolf	0	0	0	1
<i>Crucigenia tetrapedia</i> (Kirchn.) Kunt.	2	2	2	0
<i>Crucigeniella apiculata</i> (Lemm.) Kom.	0	0	5	0
<i>Crucigeniella</i> sp.	1	0	2	0
<i>Desmodesmus arthrodesmiformis</i> (Schr.) An et al.	3	1	6	0
<i>Desmodesmus bicaudatus</i> (Dedus.) Tsarenko	0	0	3	0
<i>Desmodesmus</i> cf. <i>abundans</i> (Kirchn.) Hegew.	0	0	1	0
<i>Desmodesmus</i> cf. <i>maximus</i> (West & West) Heg.	0	1	0	0
<i>Desmodesmus communis</i> (Hegew.) Hegew.	10	15	41	9
<i>Desmodesmus denticulatus</i> (Lagerh.) Hegew.	0	0	3	1
<i>Desmodesmus intermedius</i> (Chod.) Hegew.	1	1	1	0
<i>Desmodesmus opoliensis</i> (Richt.) An et al.	0	2	3	0
<i>Desmodesmus protuberans</i> (Frit. & Rich) Hegew.	0	3	1	0
<i>Desmodesmus serratus</i> (Corda) An et al.	0	0	0	2
<i>Desmodesmus</i> sp.	0	1	0	3
<i>Dictyosphaerium ehrenbergianum</i> Nägeli	0	0	3	0
<i>Dictyosphaerium</i> sp.	0	0	4	4
<i>Eudorina</i> cf. <i>cylindrica</i> Thomason	0	0	0	3
<i>Eudorina elegans</i> Ehr.	5	5	21	3
<i>Eudorina</i> sp.	0	3	8	1
<i>Genicularia</i> sp.	2	0	0	0

<i>Golenkinia</i> sp.	0	0	0	1
<i>Gonium pectorale</i> Müller	0	0	2	0
<i>Hariotina reticulata</i> Dang.	0	0	0	4
<i>Hindakia tetrachotoma</i> (Printz) Bock et al.	1	0	17	0
<i>Kirchneriella lunaris</i> (Kichn.) Schmidle	0	1	1	0
<i>Messastrum gracile</i> (Rein.) Gar.	3	7	4	0
<i>Micractinium bornhemense</i> (Conr.) Korshikov	0	0	3	0
<i>Micractinium pusillum</i> Fres.	1	1	8	1
<i>Monactinus simplex</i> (Meyen) Corda	2	1	12	7
<i>Monoraphidium</i> cf. <i>flexuosum</i> Kom.	1	9	3	7
<i>Monoraphidium</i> cf. <i>irregularis</i> G.M. Smith	6	21	22	4
<i>Monoraphidium</i> cf. <i>tortile</i> (West & West) Komark.	0	0	1	1
<i>Monoraphidium contortum</i> (Thur.) Komark.	16	5	20	2
<i>Monoraphidium griffithii</i> (Berkeley) Komark.	23	23	14	16
<i>Monoraphidium komarkovae</i> Nyg.	13	4	12	0
<i>Monoraphidium minutum</i> (Näg.) Komark.	3	3	1	0
<i>Oocystis elliptica</i> West	0	1	0	0
<i>Oocystis parva</i> West & West	0	0	5	1
<i>Oocystis</i> sp.	0	0	2	0
<i>Pandorina morum</i> (Müller) Bory	12	11	40	8
<i>Pandorina morum</i> var. <i>major</i>	0	0	1	0
<i>Paradoxia multisetata</i> Svirenko	0	0	4	0
<i>Pediastrum duplex</i> Meyen	1	1	11	0
<i>Pseudoschroederia antillarum</i> (Kom.) Hegew. & Schnepf	2	2	9	0
<i>Pyramimonas</i> sp.	0	2	1	0
<i>Raphidocelis danubiana</i> (Hind.) Marv. et al	0	0	0	1
<i>Scenedesmus eornis</i> (Ehr.) Chod.	2	3	12	0
<i>Scenedesmus obtusus</i> (Chodat) Meyen	0	0	1	0
<i>Scenedesmus</i> sp.	0	6	3	3
<i>Schroederia setigera</i> (Schroeder) Lemm.	1	1	8	0
<i>Selenastrum bibrainum</i> Reinsch.	0	0	3	0
<i>Spermatozopsis</i> cf. <i>exsultans</i> Korsh.	12	8	17	1
<i>Sphaerocystis schroeteri</i> Chod.	1	9	12	4
<i>Stauridium tetras</i> (Ehrenb.) Corda	0	2	2	0
<i>Tetradesmus incrustatulus</i> (Bohlin) Wyn.	2	0	5	0
<i>Tetradesmus lagerheimii</i> Wyn. & Guiry	4	6	7	3
<i>Tetradesmus obliquus</i> (Tur.) Wyn.	2	0	0	0
<i>Tetraedron minutum</i> (Braun) Hans.	1	1	8	3
<i>Tetrachlorella alternans</i> (Smith) Korsh.	1	0	2	0
<i>Tetraselmis cordiformis</i> (Carter) Stein	19	15	44	22
<i>Tetrastrum</i> sp.	5	0	3	2
Ulothrichal undetermined	0	0	0	2
<i>Ulothrix</i> sp.	2	0	0	1
<i>Volvocella</i> sp. 1	1	7	7	6
<i>Volvocella</i> sp. 2	3	1	6	4
<i>Volvox aureus</i> Ehr.	0	0	0	1
<i>Volvox</i> cf. <i>spermatosphaera</i> Powers	0	0	4	5
<i>Volvox</i> sp.	0	0	0	0

<i>Willea apiculata</i> (Lemm.) John et al.	0	0	0	0
<i>Willea crucifera</i> (Wolle) John et al.	1	0	3	0
Chlorococcal sp.1	2	0	0	0
Chlorococcal sp.2	4	4	1	0
Chlorococcal sp.3	8	2	1	1
Undetermined Chlorococcal	2	4	0	1
Undetermined colonia 10µ	1	0	4	0
Undetermined colonia 3µ	1	6	8	0
Undetermined colonia 5µ	0	1	5	0
Undetermined Chlorophyceae	0	1	0	2
ZYGNEPHYCEAE				
<i>Closterium aciculare</i> West	8	1	2	1
<i>Closterium acutum</i> Bréb.	21	45	50	18
<i>Closterium ceratium</i> Perty	0	1	0	2
<i>Closterium cf. calosporum</i> Witt	0	1	3	0
<i>Closterium cf. cornu</i> Ehr. ex Ralfs	0	2	1	1
<i>Closterium cf. kuetzingii</i> Bréb.	0	0	0	1
<i>Closterium cf. moniferum</i> Ehr. ex Ralfs	1	1	2	1
<i>Closterium gracile</i> Bréb. ex Ralfs	0	5	0	0
<i>Closterium</i> sp. 1	2	3	1	0
<i>Closterium</i> sp. 2	2	0	2	0
<i>Closterium</i> sp. 3	3	0	4	0
<i>Closterium</i> sp. 4	0	0	2	0
<i>Closterium</i> sp. 5	0	3	0	3
<i>Cosmarium</i> sp.	0	1	0	1
<i>Cosmarium granatum</i> Bréb. ex Ralfs	0	0	0	0
<i>Cosmarium punctulatum</i> Bréb.	0	0	0	0
<i>Mougeotia</i> sp.	1	0	0	0
<i>Sphaeroszma aubertianum</i> f. <i>archeri</i> (Gutw.) Petl.	0	0	0	2
<i>Staurastrum</i> cf. <i>anatinum</i> Cooke & Wills	1	0	0	0
<i>Staurastrum leptocladum</i> Nordstedt	1	1	0	0
<i>Staurastrum mutabile</i> Turner	0	0	1	0
<i>Staurastrum</i> sp. 1	0	0	3	1
BACILLARIOPHYCEAE				
<i>Achnanthes</i> cf. <i>inflatagrandis</i> Metzeltin et al.	1	2	1	0
<i>Achnanthes</i> sp.	6	0	1	2
<i>Achnantheidium minutissimum</i> (Kütz.) Czarn.	6	2	6	0
<i>Actinocyclus normanii</i> (Greg.) Hust.	4	1	0	0
<i>Actinocyclus normanii</i> f. <i>subsalsus</i> (Juhlin-Dannfelt) Hustedt	3	0	0	0
<i>Amphipleura pellucida</i> (Kütz.) Kütz.	2	3	2	4
<i>Amphora</i> cf. <i>copulata</i> (Kütz.) Sch.& Arch.	3	0	0	1
<i>Amphora</i> sp.	12	6	3	7
<i>Amphora</i> sp. 2	0	2	0	5
<i>Asterionella formosa</i> Hassall	1	0	0	0
<i>Aulacoseira ambigua</i> (Grun.) Sim.	3	9	6	4
<i>Aulacoseira ambigua</i> f. <i>spiralis</i> (Skuja) Ludwig	13	18	39	7
<i>Aulacoseira</i> cf. <i>distans</i> (Ehr.) Sim.	5	2	37	2
<i>Aulacoseira</i> cf. <i>italica</i> (Ehr.) Sim.	11	26	8	1

<i>Aulacoseira cf. muzzanensis</i> (Meis.) Kram.	57	53	62	47
<i>Aulacoseira granulata</i> (Ehr.) Sim.	84	92	103	69
<i>Aulacoseira granulata</i> var. <i>angustissima</i> (Mull.) Sim.	61	64	90	50
<i>Aulacoseira herzogii</i> (Lemm.) Sim.	3	11	20	1
<i>Aulacoseira islandica</i>	0	0	6	5
<i>Biremis bicontracta</i> (Østrup) Cantonati & Lange-Bertalot	1	0	0	0
Centric sp. 1	60	47	45	18
Centric sp. 2	8	12	28	1
Centric sp. 3	12	0	15	1
Centric sp. 4	1	0	2	0
<i>Centronella reicheltii</i> Voigt	2	0	0	1
<i>Cocconeis placentula</i> Ehr.	7	3	5	2
<i>Cocconeis</i> sp.	1	0	0	0
<i>Craticula</i> sp.	0	3	1	2
<i>Cyclotella meneghiniana</i> Kütz.	8	8	1	11
<i>Cyclotella</i> sp.	1	1	6	0
<i>Cymbella cf. charrua</i> Metz. et al.	0	1	0	0
<i>Cymbella cf. cistula</i> (Ehr.) Kirch.	2	0	1	0
<i>Cymbella cf. cymbelloides</i> (Grun.) Gus.	0	0	0	1
<i>Cymbella cf. dorsenotata</i> Østrup	0	0	0	1
<i>Cymbella</i> sp. 1	4	8	3	8
<i>Cymbella</i> sp. 2	0	0	0	0
<i>Denticula kuetzingii</i> Grun.	2	0	0	4
<i>Diatoma</i> sp.	0	1	0	0
<i>Diatoma vulgare</i> Bory	0	0	0	1
<i>Diploneis</i> sp.	0	0	1	0
<i>Encyonema cf. minutum</i> (Hilse) Mann	0	2	0	0
<i>Encyonema jemtlandicum</i> Krammer	7	3	3	3
<i>Encyonema</i> sp. 1	1	5	2	0
<i>Encyonema vulgare</i> Krammer	0	0	0	1
<i>Encyonopsis microcephala</i> (Grun.) Krammer	2	0	0	0
<i>Entomoncis</i> sp.	0	2	0	0
<i>Epithemia</i> sp.	1	0	1	1
<i>Eunotia bilunaris</i> (Ehr.) Scha.	1	4	0	2
<i>Eunotia cf. naegeli</i> Migula	0	1	0	1
<i>Eunotia</i> sp.	7	4	4	3
<i>Fragilaria cf. capucina</i> Desm.	4	0	0	0
<i>Fragilaria crotonensis</i> Kitton	0	4	3	0
<i>Fragilaria goulardii</i> (Bréb. ex Grun.) Lange-Bertalot	5	0	9	1
<i>Fragilaria</i> sp.	5	3	1	0
<i>Fragilaria</i> sp. 2	2	2	7	0
<i>Fragilaria</i> sp. 3	2	0	0	0
<i>Frustulia</i> sp.	1	2	0	0
<i>Geissleria</i> sp.	5	4	2	3
<i>Gomphonema capitatum</i> Ehr.	1	0	0	2
<i>Gomphonema cf. acuminatum</i> Ehr.	1	2	2	1
<i>Gomphonema cf. affine</i> Kütz.	0	0	0	1
<i>Gomphonema cf. anglicum</i> Ehr.	1	0	0	0

<i>Gomphonema cf. brasiliense</i> Grun.	0	2	0	0	
<i>Gomphonema cf. salae</i> Lange-Bertalot & Reich.	0	4	0	0	
<i>Gomphonema cf. turris</i> Ehr.	2	1	0	1	
<i>Gomphonema parvulum</i> (Kütz.) Kütz.	1	2	2	4	
<i>Gomphonema respectabile</i> Metz. et al.	1	2	0	0	
<i>Gomphonema/ Gomphoncis</i> sp. 1	14	6	2	2	
<i>Gomphonema</i> sp. 2	2	0	1	0	
<i>Gomphonema</i> sp. 3	0	1	0	0	
<i>Gomphonema</i> sp. 4	1	0	0	1	
<i>Gomphonema</i> sp. 5	0	1	0	0	
<i>Gyrosigma acuminatum</i> (Küt.) Rabenhorst	0	1	1	0	
<i>Gyrosigma cf. kuetzingii</i> (Grunow) Cleve	5	5	1	2	
<i>Gyrosigma cf. obtusatum</i> (Sulliv. & Worm.) Boyer	0	0	0	0	
<i>Gyrosigma</i> sp. 1	9	6	8	2	
<i>Halamphora montana</i> (Krass.) Lev.	2	6	0	4	
<i>Hantzschia abundans</i> Lange-Bertalot	0	0	0	1	
<i>Hantzschia amphiorys</i> (Ehr.) Grun.	0	4	0	6	
<i>Hantzschia</i> sp.	1	1	1	1	
<i>Hydrosera whampoensis</i> (Schw.) Deby	1	3	0	0	
<i>Iconella guatemalensis</i> (Ehr.) Ruck & Nakov	9	2	10	3	
<i>Lemnicola erigua</i> (Grun.) Kulik. et al.	0	0	1	1	
<i>Melosira varians</i> Agardh	27	15	13	5	
<i>Navicula capitatoradiata</i> Germain ex Gasse	2	1	1	2	
<i>Navicula cf. gregaria</i> Donkin	6	2	0	5	
<i>Navicula cf. neomundana</i> (Lange-Bertalot & Rumrich) Lange-Bertalot et al.	1	0	0	1	
<i>Navicula kuseliana</i> Lange-Bertalot & Rumrich	24	16	25	4	
<i>Navicula</i> sp. 1	11	6	5	7	
<i>Navicula</i> sp. 2	14	4	4	2	
<i>Navicula</i> sp. 3	14	4	1	14	
<i>Navicula</i> sp. 4	3	1	1	0	
<i>Navicula</i> sp. 5	0	1	6	0	
<i>Navicula</i> sp. 6	0	1	1	0	
<i>Navicula</i> sp. 7	0	2	0	0	
<i>Nitzschia acicularis</i> (Kütz.) Smith	12	3	12	2	17
<i>Nitzschia amphibia</i> Grun.	5	0	1	1	
<i>Nitzschia cf. filiformis</i> (Smith) Van Heurck	3	3	8	1	
<i>Nitzschia cf. incurva var. lorenziana</i> Ross	2	1	1	0	
<i>Nitzschia cf. scapelliformis</i> Grun.	0	1	0	0	
<i>Nitzschia cf. sigma</i> (Kütz.) Smith	2	1	0	0	
<i>Nitzschia cf. sigmoidea</i> (Nitz.) Smith	3	1	1	0	
<i>Nitzschia frustulum</i> (Kütz.) Grun.	0	0	0	5	
<i>Nitzschia fruticosa</i> Hustedt	0	7	11	0	
<i>Nitzschia linearis</i> Smith	1	2	4	1	
<i>Nitzschia palea</i> (Kütz.) Smith	25	13	28	18	
<i>Nitzschia reversa</i> Smith	0	0	3	0	
<i>Nitzschia</i> sp. 1	3	20	12	11	
<i>Nitzschia</i> sp. 2	2	3	0	1	

<i>Nitzschia</i> sp. 3	1	0	0	0
<i>Nitzschia</i> sp. 4	5	2	7	0
<i>Nitzschia</i> sp. 5	0	1	0	0
<i>Pinnularia acrosphaeria</i> Smith	1	0	0	0
<i>Pinnularia</i> cf. <i>minoricapitata</i> Kram.	0	1	0	2
<i>Pinnularia</i> cf. <i>similis</i> Hust.	1	0	0	0
<i>Pinnularia dubitabilis</i> Hust.	1	0	0	0
<i>Pinnularia fistuciformis</i> Metz. et al.	0	0	0	1
<i>Pinnularia microstauron</i> (Ehr.) Cleve	2	2	0	2
<i>Pinnularia</i> sp. 1	5	0	5	5
<i>Pinnularia</i> sp. 2	6	2	0	0
<i>Pinnularia</i> sp. 3	0	2	0	0
<i>Pinnularia</i> sp. 4	0	1	0	0
<i>Pinnularia</i> sp. 5	1	0	0	0
<i>Placoneis</i> cf. <i>elegans</i> Metz. et al.	0	1	0	0
<i>Placoneis</i> cf. <i>gracilis</i> Metz. et al.	1	1	2	0
<i>Placoneis clementis</i> (Grunow) E.J.Cox	5	5	6	4
<i>Placoneis serena</i> (Freng.) Metz.	5	0	3	4
<i>Placoneis</i> sp.	4	0	1	2
<i>Planotidium</i> sp.	1	0	0	0
<i>Pleurosira laevis</i> (Ehr.) Comp.	0	1	1	0
<i>Pseudostaurosira parasitica</i> (Smith) Morales	1	0	0	0
<i>Rhoicosphenia abbreviata</i> (Agardh) Lange-Bertalot	0	1	0	0
<i>Sellaphora parapupula</i> Lange-Bertalot	1	2	0	0
<i>Sellaphora</i> sp.	6	0	2	1
<i>Skeletonema potamos</i> (Weber) Hasle	26	20	27	12
<i>Staurosira/ Staurosirella</i> sp.	0	0	1	0
<i>Surirella angusta</i> Kütz.	0	1	0	1
<i>Surirella apiculata</i> Smith	2	3	7	0
<i>Surirella guatemalensis</i>	1	0	4	0
<i>Surirella librile</i> (Ehrenberg) Ehrenberg	1	0	0	0
<i>Surirella ovalis</i> Bréb.	0	0	0	0
<i>Surirella</i> sp. 1	0	0	0	0
<i>Surirella splendida</i> (Ehr.) Kütz.	2	1	2	1
<i>Tabularia</i> sp.	4	1	1	4
<i>Terpsinoe musica</i> Ehr.	1	1	1	0
<i>Thalassiosira</i> sp.	14	0	5	4
<i>Tryblionella</i> cf. <i>hungarica</i> (Grun.) Freng.	0	0	1	0
<i>Tryblionella levidensis</i> Smith	0	0	1	1
<i>Ulnaria acus</i> (Kütz.) Aboal	23	8	3	3
<i>Ulnaria ulna</i> (Nitzsch.) Comp.	25	18	8	15
<i>Pennada</i> sp. 1	9	12	6	2
<i>Pennada</i> sp. 2	2	10	20	1
<i>Pennada</i> sp. 3	2	3	2	1
<i>Pennada</i> sp.4	27	26	16	9
<i>Pennada</i> sp. 5	0	1	1	0
<i>Pennada</i> sp. 6	0	0	0	0
<i>Pennada</i> sp. 7	0	0	3	0

<i>Pennada</i> sp. 8	1	0	3	0
CRYPTOPHYCEAE				
<i>Chroomonas</i> cf. <i>nordstedtii</i> Hansgirg	0	1	0	6
<i>Chroomonas</i> sp.	5	15	16	1
<i>Cryptomonas</i> cf. <i>marssonii</i> Skuja	109	106	111	95
<i>Cryptomonas</i> cf. <i>ovata</i> Ehr.	62	56	56	26
<i>Cryptomonas</i> cf. <i>pyrenoidifera</i> Geitler	5	0	0	0
<i>Cryptomonas</i> cf. <i>reflexa</i> Skuja	52	58	51	27
<i>Cryptomonas</i> <i>curvata</i> Ehr.	11	23	9	13
<i>Plagioselmis</i> cf. <i>lacustris</i> (Pasch. & Rutt.) Javorn.	126	105	110	109
<i>Plagioselmis</i> <i>nanoplantica</i> (Skuja) Novarino et al.	83	52	68	57
CRYSOPHYCEAE				
<i>Dinobryon</i> <i>divergens</i> Imhof	1	0	2	0
<i>Goniochloris</i> cf. <i>fallax</i>	0	2	4	0
<i>Kephyrion</i> sp.	2	5	2	3
<i>Mallomonas</i> cf. <i>caudata</i> Iwanoff	0	2	0	0
<i>Mallomonas</i> cf. <i>tonsurata</i> Teiling	5	4	11	3
<i>Mallomonas</i> sp. 1	1	2	0	0
<i>Mallomonas</i> sp. 2	0	1	0	0
<i>Stylococcus</i> sp.	0	0	6	0
<i>Synura</i> cf. <i>uvella</i> Ehr.	13	2	1	0
DINOPHYCEAE				
<i>Ceratium</i> cf. <i>furcoides</i> (Levander) Langhans	20	17	22	19
<i>Ceratium</i> cf. <i>rhombooides</i> Hickel	2	9	1	0
<i>Ceratium</i> <i>hirundinella</i> (Müller) Dujardin	3	4	1	0
Undetermined athecate dinoflagellate	3	1	7	2
Thecate dinoflagellate 15µ	3	4	4	3
<i>Durinskia</i> <i>dybowskii</i> (Wolos.) Carty (= <i>Durinskia</i> <i>baltica</i> (K.M.Levander) Carty & Cox)	3	16	17	2
<i>Fusiperidinium</i> cf. <i>wisconsinense</i> (Eddy) McCarthy et. al	0	3	2	0
<i>Gonyaulax</i> cf. <i>apiculata</i>	0	0	1	0
<i>Gymnodinium</i> sp.	0	4	1	2
<i>Peridinium</i> cf. <i>willei</i> Huitfeldt-Kaas	0	1	13	11
<i>Peridinium</i> sp. 1	9	38	27	14
<i>Peridinium</i> sp. 2	3	1	12	4
<i>Peridinium</i> sp. 3	1	4	5	3
Peridinales sp. 4	0	0	3	1
Peridinales sp. 5	2	3	4	0
Peridinales sp. 6	1	1	2	1
Gymnodinales	0	6	1	2
Cyst of dinoflagellate	0	0	14	1
EUGLENOPHYCEAE				
<i>Euglena</i> cf. <i>gaumei</i> Allorge & Lefèvre	17	17	36	14
<i>Euglena</i> cf. <i>sanguinea</i> Ehr.	4	9	11	1
<i>Euglena</i> <i>chrenbergii</i> Klebs	0	1	2	1
<i>Euglena</i> sp. 1	0	6	6	3
<i>Euglena</i> sp. 2	4	6	6	1
<i>Euglena</i> sp. 3	0	0	1	0

Undetermined euglenoids	5	0	0	0
<i>Lepocinclis acus</i> (Müller) Marin & Melk.	4	8	10	6
<i>Lepocinclis caudata</i> (da Cunha) Pascher	6	5	3	1
<i>Lepocinclis</i> cf. <i>fusififormis</i> (Carter) Lemm.	0	0	2	0
<i>Lepocinclis</i> cf. <i>playfairiana</i> (Def.) Def.	1	2	0	1
<i>Lepocinclis</i> cf. <i>salina</i> Fritsch.	0	0	1	0
<i>Lepocinclis ovum</i> (Ehr.) Lemm.	1	2	9	3
<i>Lepocinclis oxyuris</i> (Schm.) Marin & Melk.	3	1	11	0
<i>Lepocinclis</i> sp.1 L=22 a=10	0	2	0	0
<i>Lepocinclis</i> sp.2 L=22,5 a=15	0	2	0	0
<i>Phacus acuminatus</i> var. <i>acuticauda</i> (Roll) Huber-Pest.	0	0	0	1
<i>Phacus</i> cf. <i>orbicularis</i> Hübner	0	0	1	0
<i>Phacus longicauda</i> (Ehr.) Duj.	0	2	1	1
<i>Phacus onyx</i> Poch.	0	3	2	0
<i>Phacus</i> cf. <i>succicus</i>	0	0	1	0
<i>Phacus tortus</i>	0	0	1	0
<i>Phacus</i> sp. 1	5	2	7	1
<i>Strombomonas</i> cf. <i>fluviatilis</i> (Lemm.) Defl.	3	3	15	3
<i>Strombomonas</i> cf. <i>longicauda</i> (Swir.) Defl.	0	0	1	0
<i>Strombomonas</i> cf. <i>ovalis</i> (Playf.) Defl.	1	1	7	1
<i>Strombomonas</i> cf. <i>treubii</i> (Wolosz.) Defl.	0	0	3	0
<i>Strombomonas</i> cf. <i>urcolata</i> (Stokes) Defl.	0	0	1	0
<i>Strombomonas</i> cf. <i>verrucosa</i> (Daday) Defl.	0	0	3	0
<i>Strombomonas deflandrei</i> (Roll) Defl.	0	0	0	0
<i>Strombomonas girardiana</i> (Playf.) Defl.	4	4	12	0
<i>Strombomonas scabra</i> (Playf.) Tell & Conforti	19	20	33	9
<i>Strombomonas triquetra</i> (Playf.) Defl.	0	1	1	0
<i>Strombomonas</i> cf. <i>gibberosa</i>	3	0	1	0
<i>Strombomonas</i> sp.	0	0	1	0
<i>Trachelomonas armata</i> (Ehr.) Stein	0	2	1	0
<i>Trachelomonas bacillifera</i> Playfair	1	2	2	1
<i>Trachelomonas</i> cf. <i>hispida</i> (Perty) Stein.	2	6	7	0
<i>Trachelomonas</i> cf. <i>oblonga</i> Lemm.	12	14	24	7
<i>Trachelomonas</i> cf. <i>raciborskii</i> Wolosz.	3	3	2	0
<i>Trachelomonas</i> cf. <i>superba</i> Svir.	2	0	1	0
<i>Trachelomonas</i> cf. <i>tuberculata</i> Midd.	0	0	1	0
<i>Trachelomonas</i> cf. <i>verrucosa</i> Stokes	8	10	14	2
<i>Trachelomonas hispida</i> var. <i>punctata</i> Lemm.	1	0	0	1
<i>Trachelomonas lacustris</i> Drez.	0	1	0	1
<i>Trachelomonas planctonica</i> Swirenko	21	20	23	6
<i>Trachelomonas rugulosa</i> f. <i>paralella</i> Tell & Domit.	2	1	0	0
<i>Trachelomonas rugulosa</i> Stein	42	30	39	34
<i>Trachelomonas sculpta</i> Balech	4	11	10	5
<i>Trachelomonas similis</i> var. <i>spinosa</i> Hub.-Pestalozzi	0	0	0	0
<i>Trachelomonas</i> sp. 1	1	6	1	3
<i>Trachelomonas</i> sp. 2	0	2	3	0
<i>Trachelomonas</i> sp. 3	2	1	1	0
<i>Trachelomonas</i> sp. 4	0	5	1	1

<i>Trachelomonas volvocina</i> (Ehr.) Ehr.	10	12	21	13
<i>Trachelomonas volvocinopsis</i> Swirenko	16	10	15	1
XANTOPHYCEAE				
<i>Tetraëdriella regularis</i> (Kütz.) Fott	1	0	0	0
<i>Goniochloris</i> cf. <i>fallax</i> Fott	0	0	0	0
<i>Ophiocytium capitatum</i> Wolle	0	1	0	0
RAPHIDOPHYCEAE				
<i>Gonyostomum semen</i> (Ehr.) Dies.	4	9	8	0
OTHERS				
Undetermined flagellates	3	3	6	1
Undetermined organisms	5	0	2	0

Annex 2. Canonical correspondence analysis (CCA), principal axes and abiotic variables contribution made to the main species biomass matrix

Eigenvalues	Axis 1	Axis 2	
Eigenvalues	0.32	0.11	
Percentage	3.37	1.13	
Cumulative. Percentage	3.37	4.50	
Cumulative constraint	43.17	57.70	
Species-environmental correlations	0.78	0.55	
Correlations between env. variables & CCA axes		Envl. Axis 1	Envl. Axis 2
Total Nitrogen	0.33	0.19	
Chlorophyll <i>a</i>	-0.31	0.19	
Temperature	-0.63	0.51	
Conductivity	-0.13	-0.14	
pH	-0.61	0.21	
Oxygen	0.30	0.15	
Flow	0.71	0.55	
Transparency (Secchi disc depth)	-0.64	-0.17	
Total Phosphorus	0.28	-0.16	

Acknowledgments

The authors would like to thank Profs. Jiří Komárek, Nora Maidana and Augusto Comas for their valuable comments and discussions about taxonomic issues. I am grateful to M. Dabezies, A. Kröger, L. Boccardi, G. Useta, Macarena Silva, Joe Reboledo, Marcelo Bado, J. Clemente and technicians of LATU-Fray Bentos and Montevideo for their assistance with samplings. To José and his “Coraje” vessel who are always ready to set sail. To Carlos Saizar, Elina Ordoqui and UPM pulp mill for their support. A special thanks to Maricarmen Pérez, who analyzed part of the phytoplankton samples, for her input and invaluable help with taxonomy, and for her friendship during this long and arduous monitoring study. I am very grateful to the anonymous reviewers for their comments, which helped me improve the original version of the manuscript.

REFERENCES

- Basu, B. and Pick, F.R., 1995. Longitudinal and seasonal development of planktonic chlorophyll a in the Rideau River, Ontario. In: *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52(4), pp.804–815. DOI:10.1139/f95-080
- Battarbee, R. W., 1986. Diatom analysis. In: Berghlund, B.E. And Ralska-Jasiewiczowa M., eds. *Handbook of Holocene palaeoecology and palaeohydrology*. Chichester: Wiley, pp. 527–570.
- Berón, L.E., 1990. Features of the limnological behavior of Salto Grande's reservoir Argentina-Uruguay. In: *Ecological Modelling*, 52, pp.87–102.
- Bonetto, C.A., Zalocar De Domitrovic, Y. and Vallejos, E.R., 1983. Fitoplancton y producción primaria del río Alto Paraná Argentina. In: *Physis*, 41(101), pp.81–93.
- 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, F. and Aubriot, L., 2015. Cianobacterias y cianotoxinas en ecosistemas límnicos de Uruguay. En: *Innotec*, 10, pp. 9-22.
- Bonilla, S., 1997. Composición y abundancia fitoplanctónica de tres embalses en cadena sobre el Río Negro, Uruguay. In: *Iheringia, Ser. Bot*, 49, pp.47–61.
- Box, J.D., 1981. Enumeration of cell concentrations in suspensions of colonial freshwater microalgae, with particular reference to *Microcystis aeruginosa*. In: *British Phycological Journal*, 16(2), pp.153–164.
- CARU, [s.d.]. *Archivo de Plan de concientización sobre floraciones algales* [On line]. Paysandú, Colón: CARU. [Accessed: May 21, 2020]. Available at: <http://www.caru.org.uy/web/category/plan-de-concientizacion-sobre-floraciones-algales/>
- Clarke, K. and Gorley, R. 2006. *Primer v6, user manual/tutorial, plymouth routine in multivariate ecological research*. Auckland: Primer-e.
- Clarke, K.R. and Warwick, R.M., 2001. *Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation*. 2nd ed. [s.l.]: Primer-E Ltd.
- Clarke, K.R., 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. In: *Australian Journal of Ecology*, 18(1), pp.117–143. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1993.tb00438.x>
- Cloern, J.E., Foster, S.Q. and Kleckner, A.E., 2014. Phytoplankton primary production in the world's estuarine-coastal ecosystems. In: *Biogeosciences*, 11, pp.2477-2501. doi:10.5194/bg-11-2477-2014

- Colombo, J.C., Carlos, N., Skorupka, C., Bilos, L., Tatone, N., Cappelletti, M., Migoya, C., Astoviza, M. and Speranza, E., 2015. Seasonal and inter-annual variability of water quality in the Uruguay River, Argentina. In: *Hydrological Sciences Journal*, 60(6), pp.1155-1163. DOI: 10.1080/02626667.2014.905690
- Conde, D. Pintos, W., Gorga, J., De Leon, R., Chalar, G. and Sommaruga, R., 1996. The main factors inducing chemical spatial heterogeneity in the Salto Grande, a reservoir on the Uruguay River. In: *Large Rivers*, 10 (1-4), pp.571-578.
- Chalar, G., 2009. The use of phytoplankton patterns of diversity for algal bloom management. In: *Limnologia*, 39(3), pp.200-208. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2008.04.001>
- Chalar, G., 2006. Dinámica de la eutrofización a diferentes escalas temporales: embalse Salto Grande Argentina-Uruguay. In: Tundisi, J.G., Matsumura-Tundisi, T. and Sidagis, C., eds. *Eutrophication in South America: causes, consequences and technologies for management and control*. São Carlos: International Institute of Ecology, pp.87-101.
- Chalar, G., De Leon, L., Brugnoli, E., Clemente, J., and Paradiso, M., 2002. Antecedentes y nuevos aportes al conocimiento de la estructura y dinámica del Embalse Salto Grande. In: Fernández Cirelli, A. and Chalar, G. eds. *El agua en Iberoamérica: de la limnología a la gestión en Sudamérica*. Buenos Aires: CYTED, pp.123-142.
- Chalar, G., García-Pesenti, P., Silva-Pablo, M., Perdomo, C., Olivero, V. and Arocena, R., 2017. Weighting the impacts to stream water quality in small basins devoted to forage crops, dairy and beef cow production. In: *Limnologia, Ecology and Management of Inland Waters*, 65, pp.76-84.
- De Cabo, L., Arreghini, S., Olgún, H.F., Seoane, R. and Obertello, I., 2003. Physicochemical variables and plankton from the Lower Delta of the Paraná River Argentina. in relation to flow. In: *Hydrological Processes*, 17(7), pp.1279-1290.
- de Díaz, E.N., 1961. Algas de aguas continentales de la Argentina: Fitoplancton de Ibicuy Entre Ríos. In: *Darwiniana*, 122, pp.191-202.
- De León, L. and Chalar, G., 2003. Abundancia y diversidad del fitoplancton en el Embalse de Salto Grande Argentina-Uruguay. Ciclo estacional y distribución espacial. In: *Limnetica*, 22(1), pp.103-113.
- Descy, J.P., Leitão, M., Everbecq, E. and Deliège, J.F., 2012. Phytoplankton of the River Loire, France: a biodiversity and modelling study. In: *Journal of Plankton Research*, 34(2), pp.120-135.

- Desortová, B. and Punčochář, P., 2011. Variability of phytoplankton biomass in a lowland river: response to climate conditions. In: *Limnologica*, 41(3), pp.160-166.
- Di Persia, D.H., Neiff, J.J. and Olazarri, J., 1986. The Uruguay river system. In: Davies, B.R. and Walker K.F., eds. *The ecology of river systems*. Dordrecht: Springer. (Monographiae Biologicae, vol. 60). pp.599-629. https://doi.org/10.1007/978-94-017-3290-1_12
- Dodds, W.K., 2006. Eutrophication and trophic state in rivers and streams. In: *Limnology and Oceanography*, 51(1) part 2, pp.671–680.
- Dokulil, M.T., 2014. Phytoplankton of the River Danube: composition, seasonality and long-term dynamics. In: Liska, I., ed. *The Danube River basin*. Berlin: Springer. (The Handbook of Environmental Chemistry, vol 39).
- EcoMetrix, 2006. *Cumulative impact study-Uruguay pulp mills*. [s.l.]: Internantional Finance Corporation
- Ferrari, G., Pérez, M., Dabezies, M., Míguez, D. and Saizar, C., 2011. Planktic cyanobacteria in the lower Uruguay river, South America. In: *Fottea*, 111 (1), pp. 225–234.
- García de Emiliani, M.O. and de Manavella, M.I.A., 1981. Fitoplancton de los principales cauces y tributarios del valle aluvial del río Paraná: tramo Goya-Diamante. In: *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral*, 12, pp.112–125.
- García de Emiliani, M.O., 1990. Phytoplankton ecology of the middle Paraná River. In: *Acta Limnol. Brasil*, 3, pp.391–417.
- Garnier, J., Billen, G. and Coste, M., 1995. Seasonal succession of diatoms and Chlorophyceae in the drainage network of the Seine River: observations and modeling. In: *Limnol. Oceanogr.*, 40(4), pp.750–765.
- Giblin, S., Kraig, H., Jim, F. and Terry, D., 2010. *Evaluation of light penetration on Navigation Pools 8 and 13 of the Upper Mississippi River*: Virginia: U.S. Geological Survey. (Technical Report 2010–T001).
- Haakonsson, S., Rodríguez-Gallego, L., Somma, A. and Bonilla, S., 2017. Temperature and precipitation shape the distribution of harmful cyanobacteria in subtropical lotic and lentic ecosystems. In: *Science of the Total Environment*, 609, pp.1132–1139.
- Hillebrand, H., Dürselen, C., Kirschtel, D. Pollinger, U. and Zohary, T., 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. In: *Journal of Phycology*, 35(2), pp.403–424.

- International Organization for Standardization, 2005. ISO 20179: *Water quality — Determination of microcystins — Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection*. Ginebra: ISO.
- INUMET, [s.d]. *Instituto Uruguayo de Meteorología* [On line]. Montevideo: INUMET. [Accessed: January 9, 2019]. Available at: <http://www.meteorologia.com.uy>
- Kirk, J.T.O., 1994. *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Klaveness, D., 1988. Ecology of the Cryptomonadida: a first review. In: Sandgren, Craig D., ed. *Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton*. Cambridge: Cambridge University Press. pp.105–133.
- Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J. and Johansen, J.R., 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes cyanobacterial genera 2014, using a polyphasic approach. In: *Preslia*, 864., pp.295–335.
- Komárek, J., 2013. *Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bd. 19/3: Cyanoprokaryota 3. Teil / 3rd part: Heterocytous Genera*. Berlín: Springer ISBN: 978-3-8274-0932-4
- Komárek, J. and Anagnostidis, K., 2008a. *Cyanoprokaryota. Teil 1 / Part 1: Chroococcales*. Wiesbaden: Springer Spektrum
- Komárek, J. and Anagnostidis, K., 2008b. *Cyanoprokaryota. Teil 2 / Part 2: Oscillatoriales, Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Wiesbaden: Springer Spektrum
- Kottek, M., Grieser, J., Beck, C., Rudolf, B. and Rubel, F., 2006. World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. In: *Meteorologische Zeitschrift*, 15(3), pp.259–263. DOI: 10.1127/0941-2948/2006/0130
- Kozlíková-Zapomělová, E., Ferrari, G. and del Carmen Pérez, M. 2016. *Dolichospermum uruguayense* sp. nov., a planktic nostocacean cyanobacterium from the Lower Uruguay River, South America. In: *Fottea*, 16(2), pp.189–200.
- Kruk, C., Martínez, A., Martínez de la Escalera Siri, G., Trinchin, R., Manta G., Segura, A., Piccini, C., Berna, B., Fabiano, G., Pérez, M., Gabito, L., Alcántara, I. and Yannicelli B., 2019. Floración excepcional de cianobacterias tóxicas en la costa de Uruguay, verano 2019. In: *Innotec*, 18, pp.36-68.
- Kruk, C., Piccini, C., Segura, A., Nogueira, L., Carballo, C., Martínez de la Escalera Siri, G., Calliari, D., Ferrari, G., Simoens, M., Cea, J., Alcántara, I., Vico, P. and Míguez, D., 2015. Herramientas para el monitoreo y sistema de alerta de floraciones de cianobacterias nocivas: Río Uruguay y Río de la Plata. In: *Innotec*, 10, pp.23–39.

- Lamparelli, M., 2004. *Graus de trofia em corpos d'água do estado de São Paulo: avaliação dos métodos de monitoramento* [On line]. San Pablo: Universidad de San Pablo. (Tesis de Doctorado). [Accessed: May 27, 2020]. Available at: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41134/tde-20032006-075813/publico/TeseLamparelli2004.pdf>
- Legendre, P. y Legendre, L., 2012. *Numerical ecology*. 3ra ed. Amsterdam: Elsevier. 1006p.
- Lund, J.W.G., Kipling, C. and Le Cren, E.D., 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. In: *Hydrobiologia*, 11, pp.143–170.
- Menden-Deuer, S. and Lessard, E.J., 2000. Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. In: *Limnology and Oceanography*, 45(3), pp.569–579.
- Montesanto, B., Ziller, S., Danielidis, D. and Economou-Amilli, A., 2000. Phytoplankton community structure in the lower reaches of a Mediterranean river Aliakmon, Greece. In: *Arch. Hydrobiol.*, 147(2), pp.171–191. DOI: 10.1127/archiv-hydrobiol/147/1999/171
- National Water Agency, ANA, 2005. *Aproveitamento do potencial hidráulico para geração de energia* [On line]. Brasília: ANA. (Caderno de Recursos Hídricos). [Accessed: May 21, 2020]. Available at: <http://arquivos.ana.gov.br/planejamento/planos/pnrh/VF%20Gera%C3%A7aoEnergia.pdf>
- O'Farrell, I., 1993. Phytoplankton ecology and limnology of the Salado river Buenos Aires, Argentina. In: *Hydrobiologia*, 271, pp.169–178.
- O'Farrell, I., 1994. Comparative analysis of the phytoplankton of fifteen lowland fluvial systems of the River Plate Basin Argentina. In: *Hydrobiologia*, 289 (1), pp.109–117.
- O'Farrell, I. and Izaguirre, I. 1994. Phytoplankton ecology and limnology of the River Uruguay Lower Basin Argentina. In: *Arch Hydrobiol Suppl*, 99, pp.155–179.
- O'Farrell, I. and Izaguirre, I., 2014. Phytoplankton of the middle and lower stretches of the Uruguay River. In: *Advances in Limnology*, 65, pp.113–126. DOI: 10.1127/1612-166X/2014/0065-0037
- O'Farrell, I., Bordet, F. and Chaparro, G., 2012. Bloom forming cyanobacterial complexes co-occurring in a subtropical large reservoir: validation of dominant eco-strategies. In: *Hydrobiologia*, 698, pp.175–190.

- O'Farrell, I., Izaguirre, I. and Vinocur, A., 1996. Phytoplankton ecology of the lower Paraná River Argentina. In: *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, 11(1), pp.75–89.
- Pérez, M. del C., 2002. Fitoplancton del río Negro, Uruguay. In: *Limnetica*, 21(1), pp.81–92.
- Pérez, M. del C., Bonilla, S. and Martínez, G., 1999. Phytoplankton community of a polymictic reservoir, La Plata River basin, Uruguay. In: *Revista Brasileira de Biología*, 594, pp.535–541.
- Pérez, M. del C., Maidana, N.I. and Comas, A., 2009. Phytoplankton composition of the Ebro River estuary, Spain. In: *Acta Botanica Croatica*, 681, pp.11–27.
- Quirós, R. and Luchini, L., 1982. Características limnológicas del embalse de Salto Grande, III: fitoplancton y su relación con parámetros ambientales. In: *Revista de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral*, 131, pp.49–66.
- Reynolds, C.S., 2000. Hydroecology of river plankton: the role of variability in channel flow. In: *Hydrological Processes*, 14(16-17), pp.3119–3132. [https://doi.org/10.1002/1099-1085\(200011/12\)14:16/17<3119::AID-HYP137>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1099-1085(200011/12)14:16/17<3119::AID-HYP137>3.0.CO;2-6)
- Reynolds, C.S. and Descy, J.P., 1996. The production, biomass and structure of phytoplankton in large rivers. In: *Large Rivers*, 10, pp.161–187.
- Sabater, S., Artigas, J., Duran, C., Pardos, M., Roman, A. M., Tornes, E. and Ylla, I., 2008. Longitudinal development of chlorophyll and phytoplankton assemblages in a regulated large river (the Ebro River). In: *Science of the total environment*, 404, pp.196-206.
- Sabater, S., Muñoz, I., João Feio, M., Romani, A.M. and Graça, Manuel, 2009. The Iberian rivers. In: Tockner, K., Robinson, C., and Uehlinger, U., eds. *Rivers of Europe*. Amsterdam: Elsevier, pp.113–150.
- Salmaso, N. and Braioni, M.G., 2008. Factors controlling the seasonal development and distribution of the phytoplankton community in the lowland course of a large river in Northern Italy (River Adige). In: *Aquatic Ecology*, 42, pp.533-545.
- Salto Grande Mixed Technical Commission, 2017. *Memorias de gestión* [On line]. *Concordia, Salto: CTMSG*. [Accessed: May 21, 2020]. Available at: https://www.saltogrande.org/memoria_gestion/Memoria%20Gestion%202017.pdf.
- Sienra, D. and Ferrari, G., 2006. Monitoreo de cianobacterias en la costa de Montevideo Uruguay. In: Menafrá, R., Conde, D., Scarabino, F., Menafrá, R. and Rodríguez-Gallego, L., eds. *Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguayana*. Montevideo: Vida Silvestre, pp. 413–420.

- Soares, M. C. S., Huszar, V. and Roland, F., 2007. Phytoplankton Dynamics in two tropical rivers with different degrees of human impact (Southeast Brazil). In: *River Research and Applications*, 23, pp.698-714.
- Sournia, A., ed., 1978. *Phytoplankton manual*. Paris: UNESCO. (Monographs on oceanographic methodology 6). doi:10.1002/iroh.19800650312
- Tana, J., Ferrari, G., Dabezies, M., Boccardi, L., Clemente, J., Teixeira de Mello, F. and Gonzalez, I., 2013. *Effects of Pulp Mill effluents in Río Uruguay: a review of monitoring studies in the receiving waters of UPM PULP Mill during 2008-2011*. Informe Inédito. (Informe de Asesoramiento N° 1361295). 60p.
- Ter Braak, C.J.F., 1986. Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. In: *Ecology*, 67(5), pp.1167–1179.
- UNESCO y Bonilla, S., ed., 2009. *Cianobacterias Planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión*. Montevideo: UNESCO. (Documento Técnico PHI-LAC, 16). ISBN 978-92-9089-138-3
- Utermöhl, H., 1958. Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplanktonmethodik: mit 1 Tabelle und 15 abbildungen im Text und auf 1 Tafel. In: *SIL Communications*, 9(1), pp.1–38. <https://doi.org/10.1080/05384680.1958.11904091>
- Uruguayan Technological Laboratory, LATU, 2019. *Informe sobre caracterización biológica en el tramo inferior del Río Uruguay, febrero - noviembre 2018 y evaluación 2006-2018*. Informe inédito. (Informe de Ensayo N° 1751258). 82 p.
- Uruguayan Technological Laboratory, LATU, 2018. *Informe sobre caracterización biológica en el tramo inferior del Río Uruguay, febrero - noviembre 2017 y evaluación 2006-2017*. Informe inédito. (Informe de Ensayo N° 1669101). 84 p.
- Uruguayan Technological Laboratory, LATU, 2017. *Informe sobre caracterización biológica en el tramo inferior del Río Uruguay, febrero-noviembre 2016*. Informe inédito. (Informe de Ensayo N° 1597867). 84 p.
- Uruguayan Technological Laboratory, LATU, 2016. *Informe sobre caracterización biológica en el tramo inferior del Río Uruguay, febrero-noviembre 2015*. Informe inédito. (Informe de Ensayo N° 1508147). 81 p.
- Vidal, L., y Britos, A., 2012. Uruguay: occurrence, toxicity and regulation of Cyanobacteria. In: Chorus, I., ed. *Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries*. Dessau: Umweltbundesamt. pp.130-136. ISSN 1862-4804

Wehr, J.D. and Descy, J.P., 1998. Use of phytoplankton in large river management.
In: *Journal of Phycology*, 34, pp.741-749. doi:10.1046/j.1529-8817.1998.340741.x

Zalocar De Domitrovic, Y., 2005. Biodiversidad del fitoplancton en el eje fluvial
Paraguay-Paraná. In: *Miscelánea*, 14, p. 230.

Zalocar De Domitrovic, Y., Devercelli, M. and García de Emiliani, M.O., 2007.
Phytoplankton. In: Iriondo, M. H., Paggi, J.C., and Parma, M.J., eds. *The
middle Parana River, limnology of a subtropical wetland*. Berlín: Springer-
Verlag. pp.175-203.

Modelo de calidad del agua subterránea mediante el uso combinado del análisis de componentes principales (ACP) y regresiones lineales múltiples (RLM). Caso de estudio: acuíferos de Maturín, Monagas, Venezuela

Groundwater quality model through the combined use of principal component analysis (PCA) and multiple linear regression (MLR). Case study: Maturín's aquifers, Monagas, Venezuela

Modelo de qualidade das águas subterrâneas através do uso combinado da análise de componentes principais (ACP) e regressões lineares múltiplas (RLM). Estudo de caso: acuíferos Maturín, Monagas, Venezuela

RECIBIDO: 10/3/2020 → APROBADO: 21/5/2020 ✉ jalexgil2005@hotmail.com

 GIL MARÍN, JOSÉ ALEXANDER (1)

(1) DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGRÍCOLA, ESCUELA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA (EIA), UNIVERSIDAD DE ORIENTE (UDO), MATURÍN, ESTADO DE MONAGAS, VENEZUELA.

RESUMEN

Se estudió un conjunto de datos recolectados durante el año 2016 en ocho pozos de la ciudad de Maturín, Estado de Monagas, Venezuela, en un intento por evaluar y determinar las aportaciones de la fuente que afectan la calidad del agua. Una técnica precisa de regresiones lineales múltiples (RLM) se utilizó como herramienta avanzada para el modelado y pronóstico de la calidad de las aguas subterráneas. Igualmente, se utilizó el análisis de componentes principales (ACP) para simplificar y comprender la compleja relación entre el agua y los parámetros de calidad. Se encontraron seis componentes principales responsables del 86.57% de la variación total. Se comprobó que la mayor fuente de contaminación de los acuíferos de Maturín la constituyen las descargas residuales con altos valores de coliformes fecales. El resultado del estudio mostró que el uso del ACP como entrada mejoró

la predicción del modelo RLM al reducir su complejidad y eliminar la colinealidad de datos, donde el valor de R^2 en este estudio fue de 0.99, indicando que el 99% de la variabilidad de los índices de calidad del agua (ICA) es explicada por las once variables independientes utilizadas en el modelo.

PALABRAS CLAVE: antropogénicos, análisis estadístico multivariado, monitoreo ambiental, contaminación.

ABSTRACT

A set of data collected during 2016 was studied in eight wells in the city of Maturín, Monagas, Venezuela, in order to evaluate and determine the contributions of the source that affect water quality. An accurate multiple linear regression (MLR) technique was used as an advanced tool for modeling and forecasting groundwater quality. Likewise, principal component analysis (PCA) was used to simplify and understand the complex relationship between water and quality parameters. Six main components responsible for 86.57% of the total variation were found. It was proved that the main source of contamination of Maturín aquifers was the residual discharges with high values of fecal coliforms. The result of the research showed that the use of PCA as inputs improved the prediction of the MLR model by reducing its complexity and eliminating the collinearity of data, where the value of R^2 in this study was 0.99, indicating that 99% of the variability of the water quality index (WQI) is explained by the eleven independent variables used in the model.

KEYWORDS: antropogenic, multivariate statistical analysis, environmental monitoring, pollution.

RESUMO

Um conjunto de dados coletados durante 2016 em oito poços na cidade de Maturín, Monagas, Venezuela, foi estudado na tentativa de avaliar e determinar as contribuições da fonte que afetam a qualidade da água. Uma técnica precisa de regressão linear múltipla (RLM) foi usada como uma ferramenta avançada para modelar e prever a qualidade das águas subterrâneas. Da mesma forma, a Análise de Componentes Principais (ACP) foi usada para simplificar e entender a complexa relação entre água e parâmetros de qualidade. Seis componentes principais foram encontrados, responsáveis por 86,57% da variação total. Verificou-se que a principal fonte de contaminação dos aquíferos de Maturín foram as descargas residuais com altos valores de coliformes fecais. O resultado do estudo mostrou que o uso de ACP como insumos melhorou a previsão do modelo RLM, reduzindo sua complexidade e eliminando a colinearidade de dados, onde o valor de R^2 neste estudo foi de 0,99, indicando que 99% da variabilidade dos índices de qualidade da água (ACI) é explicada pelas onze variáveis independentes usadas no modelo.

PALAVRAS-CHAVE: antropogénica, análise estatística multivariada, monitoramento ambiental, contaminação.

INTRODUCCIÓN

El agua es vital para la naturaleza y es un recurso limitante para los seres humanos y otros seres vivos. Se requiere agua de calidad y en cantidades adecuadas para satisfacer las crecientes necesidades domésticas, industriales y agrícolas (Azaza, et al., 2011; Pazand, et al., 2012). Dependiendo de su uso y consumo, puede ser un recurso renovable o no renovable. Por lo tanto, los problemas de calidad del agua y sus opciones de gestión deben recibir mayor atención en los países.

El agua subterránea es la principal fuente de agua para fines domésticos, agrícolas e industriales en el mundo. Se estima que aproximadamente un tercio de la población mundial usa agua subterránea para beber (Simge y Aysen, 2014). Entre las diversas razones, las más importantes son la falta de disponibilidad de agua superficial potable y la creencia general de que el agua subterránea es más pura y segura que el agua superficial debido a las cualidades protectoras de la cubierta del suelo (Mishra, et al., 2005; Arumugam y Elangovan, 2009). Sin embargo, en los últimos años, debido a la llegada del crecimiento industrial, la aplicación a gran escala de fertilizantes sintéticos para la producción agrícola y el uso de pesticidas e insecticidas para la producción han causado una gran preocupación respecto a la susceptibilidad de contaminación del agua subterránea.

Los cambios naturales en la calidad del agua subterránea se deben a la interacción roca-agua y a las reacciones de óxido-reducción durante la filtración del agua a través de los acuíferos. Además de estos procesos, los agentes patógenos transmitidos por el agua, los contaminantes tóxicos y no tóxicos son los principales parámetros de calidad del agua que se transportan desde el área de recarga al área de descarga a través de los acuíferos por el movimiento del agua subterránea (Simge y Aysen, 2014). La calidad del agua se identifica en términos de sus parámetros físicos, químicos y biológicos. Las aguas subterráneas contaminadas no pueden lograr un ecosistema equilibrado. Un ecosistema equilibrado es aquel en el que los seres vivos y el medio ambiente interactúan de forma beneficiosa entre sí. La calidad del agua obviamente juega un papel crítico en esta relación (Ntengwe, 2006), ya que es clave para el mantenimiento de un entorno bien equilibrado.

Un problema particular en el caso del monitoreo de la calidad del agua es la complejidad asociada al análisis de la gran cantidad de variables medidas. Los conjuntos de datos contienen abundante información sobre el comportamiento de los recursos hídricos. La clasificación, el modelado y la interpretación de los datos monitoreados son los pasos más importantes en la evaluación de la calidad del agua (Boyacioglu, 2006). La aplicación de diferentes técnicas estadísticas multivariadas, como el análisis de conglomerados (AC), el análisis de componentes principales (ACP), el análisis factorial (AF) y el análisis de regresión múltiple (ARM) ayudan a identificar componentes o factores importantes, representando la mayoría de las variaciones de un sistema (Ouyang, et al., 2006; Shrestha y Kazama, 2007). Están diseñados para reducir el número de variables a un pequeño número de índices al intentar preservar las relaciones presentes en los datos originales. El objetivo de este estudio consistió en utilizar los ACP y ARM en los estudios de calidad del agua para extraer los parámetros más relevantes que permitan evaluar las variaciones en la calidad de las aguas subterráneas de la ciudad de Maturín.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio

El trabajo se llevó a cabo en la ciudad de Maturín, municipio de Maturín, estado de Monagas, situado geográficamente a 9°46'46" de latitud norte y 63°11'05" de longitud oeste, y a una altura de 63.5 m.s.n.m (Figura 1). Holdridge, citado por Gil y otros (2012), señalan que el clima de la zona es del tipo bosque seco tropical, caracterizado por presentar una estación lluviosa de mayo a diciembre y una estación seca de enero a abril, con una precipitación media anual de 1219.6 mm, una temperatura media anual de 25.9 °C, una evapotranspiración potencial de 1372 mm y una evaporación de 1573 mm. Tiene una superficie de 13.352 km² y es la sexta urbe más grande del país con 542.259 habitantes (Instituto Nacional de Estadística, 2011).



Figura 1. Ubicación geográfica de la Ciudad de Maturín. Estado Monagas. Venezuela. Fuente: (Gil, et al., 2012).

Según el Ministerio del Poder Popular del Ambiente (2009), los acuíferos de Maturín se encuentran ubicados en la región hidrológica de la provincia del Orinoco, en el sistema acuífero Mesa-Las Piedras, y se caracterizan por presentar una profundidad media de 40 m, un nivel medio de 10 m y un caudal de 10.5 l/s. Constituyen uno de los reservorios subterráneos con mayor potencial del país con unidades litológicas de sedimentos poco o nada consolidados (gravas, conglomerados, areniscas, con intercalaciones de arcillas y lutitas), que cubren un área de 352.000 km² (Duran, 2011).

Lugares de muestreo

Se realizó una encuesta detallada dentro de un radio de 10 km en Maturín para identificar los pozos de perforación activos que se utilizan con fines agrícolas y consumo humano. En consecuencia, se seleccionaron 8 pozos de perforación en diferentes lugares (Figura 2) para el muestreo del agua, de los cuales 5 lugares (P1, P2, P3, P5, y P7) se ubicaron en zonas urbanas, y 3 en zonas rurales y agrícolas (P4, P6 y P8).

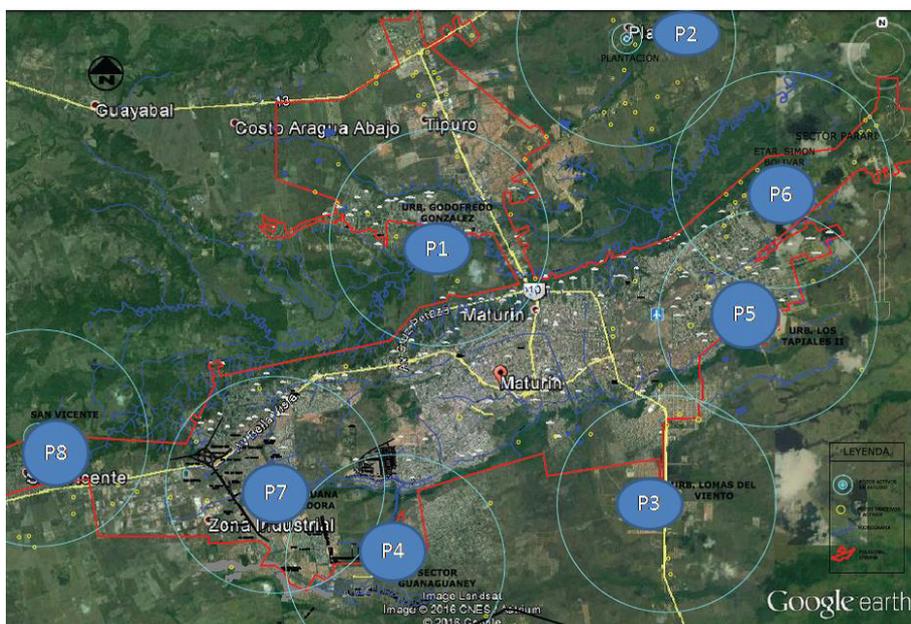


Figura 2. Ubicación de los pozos de muestreo.

Conjunto de datos

En este estudio, veinte parámetros de calidad del agua fueron observados a lo largo de los pozos de monitoreo del acuífero. Un total de 960 observaciones se utilizaron para la distribución de fuentes y técnicas de modelado. El índice de calidad del agua (ICA) se determinó para evaluar el estado de la calidad del agua y la clasificación de la clase del acuífero en base a los datos de calidad del agua, utilizando la metodología empleada por Gil y otros (2018). Los veinte parámetros de calidad del agua consistieron en: fenoles, hierro (Fe), calcio (Ca), magnesio (Mg), manganeso (Mn), sodio (Na), potasio (K), nitrito (NO_2), nitrato (NO_3), sulfato (SO_4), bicarbonatos (HCO_3), carbonatos (CO_3), coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF), temperatura, conductividad eléctrica (CE), pH, total de sólidos disueltos (TDS), dureza (mg/l) y cloro (Cl). El ICA proporciona una manera útil de predecir cambios y tendencias en la calidad del agua considerando múltiples parámetros. Por lo tanto, en este estudio se formó con catorce variables seleccionadas: coliformes fecales (CF), temperatura, conductividad eléctrica (CE), pH, sodio (Na), manganeso (Mn), hierro (Fe), fenoles, potasio (K), nitrito (NO_2), nitrato (NO_3), sulfato (SO_4), dureza (mg/l) y cloro (Cl).

Tratamiento previo del conjunto de datos

Los datos se dispusieron inicialmente según las estaciones y el mes de muestreo. A todos los datos se les aplicó la prueba de normalidad de Wilk-Shapiro (Azkue y Soto, 2004), con una probabilidad del 95%. La hipótesis nula de que los datos son normales es rechazada al nivel de significancia α ($\alpha = 0.05$) si la probabilidad de la prueba es inferior al nivel de significancia ($p \leq 0.05$). Esta se llevó a cabo con el paquete estadístico SAS, versión 8.0, y el procedimiento “univariate”. Luego, el cálculo estadístico de ACP y RLM se realizó utilizando el software SPSS, versión 16.0.

Análisis de componentes principales (ACP)

El análisis de componentes principales presenta los parámetros más significativos y describe la reducción de datos de una representación de conjunto de datos completos, con la pérdida mínima de información original (Helena, et al., 2000 y Wunderlin, et al., 2001). Los ACP son sensibles a los valores atípicos, a los datos que faltan y a la mala correlación lineal entre las variables debido a la insuficiencia de las variables asignadas (Sarbu y Pop, 2005). Por lo tanto, debe realizarse un tratamiento previo detallado al conjunto de datos para obtener una imagen más clara en datos complejos. Es una técnica prominente para el reconocimiento de patrones en los intentos de explicar la varianza de un gran conjunto de variables correlacionadas y la transformación en un conjunto más pequeño de variables independientes (no correlacionadas) (componentes principales). El componente principal (CP) se expresa como:

$$Y_{ij} = Z_{i1}X_{1j} + Z_{i2}X_{2j} + Z_{i3}X_{3j} + \dots + Z_{im}X_{mj} \dots \dots (1)$$

Donde Z es la carga del componente, Y es la puntuación del componente, X es el valor medido de una variable, i es el número del componente, j es el número de la muestra y m es el número total de variables. Mientras tanto, el análisis factorial (AF) intenta extraer una estructura lineal de dimensión inferior del conjunto de datos. Reduce aún más la contribución de las variables menos significativas obtenidas de ACP y el nuevo grupo de variables conocidas como varifactores (VF), que se extrae mediante la rotación del eje definido por ACP. En el AF, el concepto básico se expresa en la ecuación 2.

$$Y_{ji} = Z_{p1}P_{1i} + Z_{p2}P_{2i} + Z_{p3}P_{3i} + \dots + Z_{pr}P_{ri} + C_{pj} \dots \dots (2)$$

Donde Y es el valor medido de una variable, i se refiere a la carga del factor, P es la puntuación del factor, C es el término residual que representa los errores u otras fuentes de variación, i es el número de muestra, j es el número de la variable y r es el número total de factores. Principalmente, los métodos ACP y AF se expresan en ecuaciones similares; la diferencia está en CP, donde se expresa como una combinación lineal de variables medidas. Mientras que en AF, la variable medida se expresa como una combinación de factores y la ecuación contiene el término residual y, por lo tanto, un VF puede incluir variables latentes no observables, hipotéticas (Helena, et al., 2000, Wunderlin, et al., 2001 y Liu, et al., 2003).

El análisis de componentes principales o el análisis factorial se realizó en la matriz de correlación de los datos reorganizados (todas las observaciones para cada grupo de sitios), por lo tanto explica la estructura del conjunto de datos subyacentes. La matriz de coeficientes de correlación mide qué tan bien puede explicarse la varianza de cada constituyente en función de la relación entre sí. El ACP de las variables normalizadas (conjunto de datos de calidad del agua) se realizó para extraer CP significativos y reducir aún más la contribución de las variables con menor importancia; estos CP se sometieron a rotación varimax (en bruto) generando VF.

Los CP resultantes de ACP a veces no se interpretan fácilmente y la rotación de varimax debe realizarse para reducir la dimensionalidad de los datos e identificar las nuevas variables más significativas. El coeficiente del factor varimax (VF) con una correlación de > 0.75 se explica como una carga de factor significativo fuerte (Liu, et al., 2003). Mientras que los rangos de correlación de 0.75-0.50 y 0.50-0.30 se consideran carga de factores moderada y débil respectivamente. En pocas palabras, el análisis de componentes principales tiene como objetivo descubrir un conjunto más subyacente de factores que explican el patrón principal de todas las variables originales (Saima, et al., 2009).

Análisis de regresión lineal múltiple (RLM)

El análisis de regresión lineal múltiple (RLM) nos permite establecer la relación que se produce entre una variable dependiente Y y un conjunto de variables independientes (X_1, X_2, \dots, X_k). El análisis de regresión lineal múltiple, a diferencia del simple, se aproxima más a situaciones de análisis reales; puesto que los fenómenos, hechos y procesos naturales son complejos por definición y, en consecuencia, deben ser explicados en la medida de lo posible por la serie de variables que, directa e indirectamente, participan en su concreción (Karim y Abdolrahman, 2011).

La anotación matemática del modelo o ecuación de regresión lineal múltiple es la siguiente:

$$Y_u = \beta_0 + \beta_1 X_{u1} + \beta_2 X_{u2} + \dots + \beta_k X_{uk} + \mathcal{E}_u \dots \dots (3)$$

Donde Y_u denota la respuesta observada en el intento u o variable dependiente, X_{ui} representa el nivel del factor i en el intento u o variables independientes, las β son parámetros desconocidos y \mathcal{E}_u representa el error aleatorio en Y_u .

En el análisis de regresión lineal múltiple, la construcción de su correspondiente ecuación se realizó con el método “*stepwise*” o *paso a paso*, seleccionando las variables una a una. La finalidad fue buscar entre todas las posibles variables explicativas (parámetros físicos, químicos y biológicos) aquellas que más y mejor expliquen la variable dependiente (ICA), sin que ninguna de ellas sea una combinación lineal de las restantes. Este procedimiento implica tres pasos: en el primero, solo se introduce aquella variable que cumple con los criterios de entrada; en segundo lugar, se valora si la misma cumple con los criterios de salida; y por último último, se calculan los factores de bondad de ajuste de los datos al modelo de regresión lineal y los parámetros del modelo verificado. El proceso se inicia sin ninguna variable independiente en la ecuación de regresión y el proceso concluye cuando no queda ninguna variable fuera de la ecuación que satisfaga el criterio de selección (garantiza que las variables selec-

cionadas son significativas) y/o el criterio de eliminación (garantiza que una variable seleccionada no es redundante). El análisis comenzó con 20 variables explicativas y terminó recomendando solo 11 variables.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las estadísticas descriptivas relacionadas con la calidad del agua se presentan en la Tabla 1. Los valores de calidad del agua para el manganeso, nitrito, nitrato, fenol y coliformes fecales sobrepasan los límites permisibles según la Organización Mundial de la Salud (Organización Mundial de la Salud, 2006) y la normativa nacional Decreto N° 883 (Venezuela, 1995). Para el pH, el valor promedio se encuentra un poco por debajo del valor umbral. Los valores de dureza, sodio (Na), conductividad eléctrica (CE) y cloruro (Cl) parecen ser de desviación estándar muy alta. Estas variables cambian considerablemente en los pozos con respecto a sus valores promedios, pero no influyen en la calidad de sus aguas porque no sobrepasan los valores límites establecidos en las normas planteadas.

Tabla 1. Estadísticos descriptivos básicos de los parámetros físicos, químicos y biológicos estudiados en 8 pozos del Municipio de Maturín. Período marzo-mayo, 2016.

Parámetro	Unidad	RANGO (Nº DE POZOS)			LMP		
		Mínimo	Máximo	Media	Decreto 883*	OMS	Desviación Estándar
Temperatura	°C	28.20 (P-4)	31.20 (P-3)	29.51 (P-3,5,8)			0.66
pH		4.12 (P-6)	7.56 (P-1)	5.57	6.0-8.5		1.01
Dureza	mg/l	15.15 (P-4)	217.17 (P-1)	27.73	500.0		63.08
CE	µS/cm	30.00 (P-4)	600.00 (P-1)	152.19		3000	177.20
Fe	mg/l	0.00 (P-6)	0.54 (P-1)	0.09 (P-3)	0.1	0.3	0.14
Mn	mg/l	0.00 (P-1,2,3,4,5,6,7)	0.50 (P-8)	0.09	0.1	0.5	0.15
Na	mg/l	2.53 (P-4)	90.62 (P-)	30.35	200		22.38
K	mg/l	5.00 (P-2)	40.00 (P-1,4,7)	25.00		50	8.34
NO ₂	mg/l	0.00 (P-2,3,4,5,6,7,8)	22.00 (P-8)	4.04	5	3	6.07
NO ₃	mg/l	4.50 (P-3)	59.50 (P-2)	25.13	5	50	12.80
SO ₄	mg/l	0.00 (P-1,2,3,4,5,6,7,8)	45.00 (P-1)	5.42	400	250	12.24
Cl	mg/l	30.00 (P-2)	150.00 (P-6)	67.92	600	250	27.97
Fenoles	mg/l	0.0026(P-2)	0.0224 (P-3)	0.0075	0.002		0.063
CF	NMP/100ml	0 (P-1,2,3,4,5,6,7,8)	4300 (P-1)	260.75	0		913.1636

LMP=Límite máximo permitido por la normativa venezolana, Decreto 883 (Venezuela, 1995) y la Organización Mundial de la Salud, 2006.

Análisis de componentes principales (ACP)

Antes de ejecutar los análisis de componentes principales (ACP), se aplicó la prueba de Kolmogorov Smirnov (K-S) a todo el conjunto de datos para comprobar si se ajustaron a una distribución normal. La prueba K-S indicó que todas las variables siguen una distribución normal de registro. Por otra parte, a fin de confirmar la idoneidad de los datos para el análisis de componentes principales se aplicaron las pruebas de Kaiser-Mayer-Olkin (KMO) y de esfericidad Barlett. La prueba de KMO mide adecuación del muestreo y señala la fracción de variables que tienen varianza común. Los valores de KMO superiores a 0.5 son considerados como satisfactorios para ACP. En el presente estudio, el valor de 0.575 (Tabla 2) indica que el conjunto de datos estuvo en forma para el análisis de componentes principales. En tanto, la prueba de esfericidad de Barlett indica si las variables están significativamente relacionadas y si la matriz de correlación es una matriz de identidad. El nivel de significancia de 0.00 para este estudio indicó claramente que la matriz de correlación no es la matriz de identidad y que las variables están significativamente relacionadas.

El análisis de componentes principales se aplicó a los datos obtenidos de los ocho sitios de muestreo, utilizando el software SPSS 16.0. Los resultados del ACP en la matriz de correlación y factores fueron extraídos por el método del centroide rotado a través de la rotación Varimax (Ahmed, 2005). Existen reglas para determinar el adecuado número de factores a conservar. Entre ellas se encuentra el que se conoce como criterio de Kaiser (Kaiser, 1960), que indica que hay que conservar los componentes principales cuyos valores propios sean mayores que la unidad o que el porcentaje de varianza total explicada por cada componente o factor (varianza acumulada) sea lo suficientemente alto (Holland y Witthuser, 2009; Belkhiri, et al., 2010; Kanade y Gaikwad, 2011). Bajo estos criterios, solo los factores con valores propios mayores o iguales a 1 fueron aceptados como posibles fuentes de varianza en los datos, con la más alta prioridad atribuida al factor que tiene la suma más grande del eigenvector (Belkhiri, et al., 2010). Los autovalores indican la importancia del factor, valores mayores a 1 son considerados significativos. Los resultados del ACP señalaron que los primeros seis valores de los autovalores son mayores a 1 y por lo tanto fueron considerados como significativos. En la figura 3 se puede observar que la mayor parte de la variación en los datos originales se explica por los primeros seis factores.

Tabla 2. Prueba de KMO y Bartlett.

Medida de adecuación muestral de Kaiser-Meyer-Olkin.		0.575
Prueba de esfericidad de Bartlett		
Chi-cuadrado aproximado	571.638	
Gl	171	
Sig.	0.00	

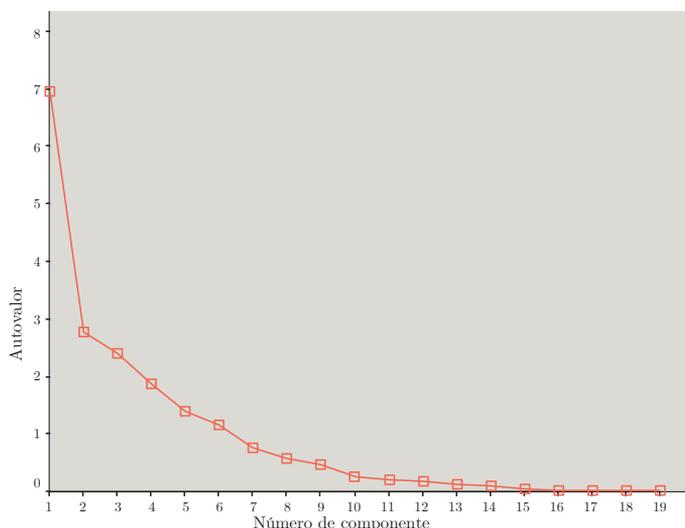


Figura 3. Gráfico de sedimentación.

Los valores propios para diferentes factores, varianza porcentual, variación porcentual acumulada y componentes cargados (sin rotar y Varimax rotadas), son presentados en la Tabla 3. Este análisis condujo a la explicación del 86.57% de las varianzas en los datos. Los parámetros de carga para los seis componentes del ACP del conjunto de datos se dan en la Tabla 4. Liu y otros (2003) clasificaron a las cargas factoriales como “fuertes”, “moderadas” y “débiles”, correspondientes a valores de carga absolutos de > 0.75, 0.75–0.50 y 0.50–0.30, respectivamente. A modo de determinar el factor relevante para cada factor solo se tomaron en cuenta valores superiores a 0.65.

Tabla 3. Análisis de componentes principales por método de extracción.

Componente	Varianza total explicada								
	Autovalores iniciales			Sumas de las saturaciones al cuadrado de la extracción			Sumas de las saturaciones al cuadrado de la rotación		
	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado
1	6.930	36.475	36.475	6.930	36.475	36.475	5.966	31.400	31.400
2	2.766	14.558	51.033	2.766	14.558	51.033	2.934	15.443	46.843
3	2.392	12.587	63.620	2.392	12.587	63.620	2.098	11.043	57.887
4	1.847	9.719	73.338	1.847	9.719	73.338	2.095	11.024	68.911
5	1.375	7.238	80.577	1.375	7.238	80.577	1.976	10.400	79.311
6	1.139	5.996	86.573	1.139	5.996	86.573	1.380	7.262	86.573
7	.732	3.854	90.427						
8	.732	2.943	93.370						
9	.443	2.330	95.700						
10	.250	1.313	97.014						
11	.182	.958	97.972						
12	.161	.846	98.818						
13	.118	.621	99.439						
14	.069	.365	99.804						
15	.018	.096	99.900						
16	.012	.063	99.964						
17	.007	.034	99.998						
18	.000	.001	99.999						
19	.000	.001	100.000						

Método de extracción: análisis de componentes principales.

Tabla 4. Matriz de componentes rotados.

	Componente					
	1	2	3	4	5	6
Temperatura	.114	-.003	.060	.079	.186	.922
pH	.794	.013	.394	.123	-.075	.304
CE	.946	.258	.046	-.017	.111	-.014
TDS	.944	.251	.062	-.033	.111	-.018
Dureza	.973	.195	.052	.041	.013	-.025
Fe	.569	.563	.013	-.045	.023	.194
Ca	.971	.213	.060	.019	.010	.004
Mg	.015	.056	.637	.072	.563	.057
Mn	.055	-.207	.233	.195	.878	-.056
Na	-.178	-.095	-.923	.096	-.167	.044
K	.006	.430	.132	.536	.119	-.467
NO ₂	.105	.121	-.012	-.235	.868	.242
NO ₃	.185	-.058	.057	-.812	.030	-.032
SO ₄	.580	.512	.047	.194	-.034	-.117
Cl	.359	.098	-.482	.671	.059	-.059
HCO ₃	.830	-.168	-.261	-.234	.118	.117
Fenol	.025	-.200	.537	.685	-.068	.259
CT	.172	.956	.058	.026	-.050	-.112
CF	.233	.944	-.023	.031	-.013	.028

Método de extracción: Análisis de componentes principales.

Método de rotación: Normalización Varimax con Kaiser.

^a. La rotación ha convergido en 8 iteraciones.

El primer componente (CP1), denominado componente geológico, explica el 36.48% de la varianza total, presentando una fuerte correlación positiva con las variables pH, CE, Ca, dureza, TDS, y HCO₃. Esta combinación de variables destaca el grado natural de mineralización del agua y podría estar relacionada con la geología del área estudiada, derivada de los procesos de evaporación y disolución. Por otro lado, esto indica que las variables CE, Ca, dureza, TDS y HCO₃ en el área de estudio están muy influenciadas por los valores del pH. Los valores de pH presentaron un valor mínimo de 4.12 (P6) y un máximo de 7.56 (P1), con un promedio de 5.57, que les otorga a las aguas subterráneas de la ciudad de Maturín una naturaleza ligeramente ácida. A pH bajo, una parte importante del carbono inorgánico disuelto está como ácido carbónico (H₂CO₃) o CO₃ disuelto. Además, las aguas subterráneas suelen contener cantidades apreciables de ácido silícico no disociado, que se suele expresar como sílice disuelta. En general, un agua con un pH menor a 6.5 podría ser ácida y corrosiva. La dureza depende de la presencia de Ca²⁺ y Mg²⁺ en el agua. Un patrón similar en la variación estacional de dureza y HCO₃ se debe posiblemente a la disolución de minerales como la calcita y la dolomita a través del proceso de meteorización HCO₃. Este proceso está representado por la siguiente reacción simplificada (Cai, et al., 2007).



La reacción del CaCO_3 mineral con dióxido de carbono disuelto (ácido carbónico) libera HCO_3^- y Ca^{2+} en el agua del acuífero. Existe una relación inversa entre la temperatura y el CO_2 disuelto (Zare, et al., 2011), por lo tanto, la intensidad de la intemperie de carbonatos y la concentración de HCO_3^- y dureza es mayor en las estaciones frías y menor en las estaciones cálidas.

El segundo componente (CP2) representa el 14.56% de la varianza total, y fue correlacionado de manera fuertemente positiva con las variables CT y CF, lo que revela la intensiva descarga de aguas residuales en el acuífero. Este componente principal representa un factor microbiológico de la calidad del agua. En esta investigación, se observó un valor mínimo de 0 NMP/100ml de coliformes fecales y un valor máximo de 4,300 NMP/100ml, que sobrepasa en más de un 4,000% al máximo permitido por la normativa vigente, siendo el valor promedio de 260.75 NMP/100ml. Estos altos valores de coliformes fecales tienen como causa principal la filtración de aguas contaminadas hacia los acuíferos debido a una mala disposición de sus desechos fecales (pozos sépticos, napas freáticas y otros) y a las actividades pecuarias de la zona. Las bacterias coliformes se excretan en grandes cantidades en las heces de los humanos y otros animales de sangre caliente. En consecuencia, el agua contaminada por materia fecal se identifica como potencialmente peligrosa debido a los organismos indicadores que coexisten con *Escherichia coli* (*E. coli*), que causa el cólera (Cansu, et al., 2008). Algunos ejemplos de enfermedades causadas por beber o nadar en agua contaminada con heces son diarrea, cólera, disentería e infecciones de piel, ojos, oídos, nariz y garganta (Organización Mundial de la Salud, 2006).

El CP3, denominado factor mineral, representa el 12.59% de la varianza total del conjunto de datos del agua del acuífero y muestra una fuerte correlación negativa con el sodio (Na) y una moderada correlación positiva con el magnesio (Mg). Este factor contiene variables hidrogeoquímicas (Mg y Na), que se originan en la mineralización de los componentes geológicos de los acuíferos. La contribución de Mg a este factor puede considerarse como resultado de los procesos de intercambio de cationes en la interfaz suelo-agua (Guo y Wang 2004) y la disolución de minerales con calcio que se encuentran en la región (Memet y Bulent, 2009). Según Beita-Sandí y Barahona (2010), el Na en aguas naturales varía de manera considerable dependiendo de las condiciones geológicas locales y las descargas de aguas residuales. La correlación negativa del Na indica que su introducción en el agua subterránea no se debe a la disolución natural del suelo o la roca, y la fuente de este parámetro puede estar relacionada con una contaminación del tipo antropogénica.

El CP4 representa el 9.72% de la varianza total y muestra una fuerte correlación negativa con los nitratos (NO_3^-) y una moderada correlación positiva con fenoles y Cl. Este componente principal representa un factor de contaminación orgánica de la calidad del agua, que se produce por desechos domésticos y nutrientes. Mientras se produzca nitrificación en el agua, un aumento en NO_3^- y una reducción en NH_4^+ es un evento normal. En cuanto al nitrato (NO_3^-), se observó su presencia en todos los puntos de muestreo, resultando con mayor concentración el P2, con valores de 59.50

mg/l, y un valor mínimo para el P3 con 4.50 mg/l. A pesar de que las aguas subterráneas presentaron nitrato, solo en P2 se observaron valores por encima de la normativa (Organización Mundial de la Salud, 2006). El NO_3^- presente en las aguas subterráneas tiene un origen orgánico. Los altos valores de esta especie se asocian con la actividad antrópica, excreto de animales, uso de fertilizantes (Cardona, et al., 2004 y Jin, et al., 2004). La concentración de esta especie en aguas subterráneas no contaminadas varía ampliamente, aunque no suele sobrepasar los 10 mg/l (Porrás, et al., 1985). Para el fenol, ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) se observaron diferencias significativas en los meses de muestreo y en los pozos estudiados, dando como resultados valores mayores a 0.002 mg/l en todos los muestreos, valor umbral indicado por la normativa Decreto N° 883 (Venezuela, 1995). Las concentraciones de este compuesto en las aguas subterráneas de la ciudad de Maturín son alarmantes ya que las estudiadas durante el periodo de lluvia incrementaron los valores del compuesto químico, sobrepasando los niveles permitidos. Esto es sumamente inquietante ya que estudios científicos señalan que un exceso de este compuesto en el agua para consumo puede generar toxicidad, debido a su acción cancerígena y mutagénica en los seres vivos (Nieves, et al., 2005), además de alteraciones en el intestino y en muchos casos la muerte, según la concentración de ingesta. Su presencia en las aguas subterráneas de Maturín es una característica que se debe analizar con más detalle ya que su incorporación a los acuíferos puede estar asociado a procesos de contaminación de la fuente por desechos industriales, aguas servidas o residuales y/o agentes químicos que presenten este compuesto fenólico (Díaz, et al., 2005). Por otra parte, el cloruro en el agua potable se origina de fuentes naturales, aguas residuales, efluentes industriales y escorrentía urbana. Su concentración excesiva aumenta la velocidad de corrosión de los metales en el sistema de distribución de agua y depende de la alcalinidad del agua; y esto puede llevar a un aumento de las concentraciones de metales en el suministro (Organización Mundial de la Salud, 2006).

El quinto componente (CP5) explica el 7.24% de la varianza total, presentando una fuerte correlación positiva con las variables NO_2^- y Mn; y se puede asumir como un componente antropogénico tóxico. En el proceso de nitrificación, NO_2^- es un intermediario inestable que tiende a transformarse en NO_3^- . El manganeso (Mn) no existe como un metal libre en la naturaleza, pero forma parte de otros minerales, algunos de los cuales incluyen diferentes óxidos, silicatos, boratos, sulfuros, carbonatos y fosfatos (Nádaská, et al., 2010). El Mn se introduce en ambientes acuáticos a través de fuentes antropogénicas, como descargas de aguas residuales municipales, lodos de depuración, emisiones de las industrias de aleaciones, hierro y acero, y procesamiento de minerales y minería. Además de ser un elemento esencial para el ser humano y otros animales, tanto la carencia como la sobreexposición pueden causar efectos adversos, como lo indican diversos estudios que han notificado efectos neurológicos adversos tras la exposición prolongada a concentraciones muy altas en el agua de consumo (Calla y Cabrera, 2010). La presencia de Mn puede derivarse de la generación de procesos de reducción (bajo potencial redox) en las corrientes contaminadas con aguas residuales; estos procesos solubilizan metales como el Mn (Chávez-Alcántar, et al., 2011). Las aguas residuales son también fuente de metales pesados (Chávez-Alcántar, et al., 2011). A pesar de la ausencia del elemento en algunos pozos, se evidenció su presencia en otros, y en concentraciones que sobrepasan la normativa

sanitaria (0.1 mg/l). Los pozos P2, P4, P5 y P6 no evidenciaron la presencia de este elemento, por lo que el promedio general de manganeso estuvo en $0,09 \pm 0,15$ mg/l, con un valor máximo de 0,50 mg/l para el P8 y un mínimo de 0,00 mg/l.

El último componente (CP6), denominado componente físico, explica el 5.99% de la varianza total, presentando una fuerte correlación positiva con la variable temperatura. La temperatura es una de las variables fundamentales a ser medidas en ambientes acuáticos, debido a su influencia en todos los procesos hidrológicos, químicos y biológicos. Tiene gran efecto en la solubilidad de las sales y las reacciones biológicas de los seres vivos, y también acelera la putrefacción y la demanda de oxígeno (Benítez, 2004). Además influye en el pH, afecta los procesos físicos y químicos (pH, equilibrio iónico, velocidades de reacción) y los procesos biológicos (tasa metabólica, descomposición de materia orgánica); y por lo tanto, repercute en el efecto de los agentes contaminantes (Villa, 2011). La temperatura es un parámetro muy importante para un acuífero. En este sentido, Gil (2003) señala que, por lo general, las temperaturas de las aguas subterráneas permanecen constantes a menos de que existan factores externos que intervengan.

Análisis de regresión lineal múltiple (RLM)

Básicamente, la RLM se basa en un proceso lineal de ajuste de mínimos cuadrados y requiere un elemento traza o propiedad a ser determinada para cada fuente o categoría de fuente (Mohd, et al., 2011). La RLM se utilizó para identificar las posibles fuentes de contaminación en los pozos muestreados. Dos tipos de modelos básicos de receptores que generalmente se aplican a la fuente son el balance químico de masa (BQM) y las técnicas multivariadas (Gordon, 1988). Usando el paquete estadístico SPSS, versión 16.0, se realizó el análisis de regresión múltiple para determinar los factores que contribuyen con el índice de calidad del agua. En este análisis se fijó el índice de calidad del agua (ICA) como variable dependiente, y pH, CE, Fe, Mn, Na, NO_2 , NO_3 , SO_4 , Cl, Fenol y CF como variables independientes (o predictoras).

El procedimiento *Stepwise* de SAS, con la opción de Backward, que comenzó con las 20 variables tomadas en consideración para el análisis de los ICA, finalmente nos redujo el número de variables a 11 sin perder la precisión en el análisis de datos, con un R^2 igual a 0.9999. Según Grivas y Chaloulakou (2006), el procedimiento de regresión múltiple por pasos se usa comúnmente para producir un modelo parsimonioso que maximiza la precisión, con un número opcionalmente reducido de variables predictoras. El coeficiente β representa el coeficiente en el modelo para predecir la calidad del agua. ET representa el error estándar o típico del coeficiente β , mientras que el β estandarizado es el peso de cada variable independiente. Esto es más importante, ya que el objetivo principal del estudio es evaluar la influencia de los predictores en la calidad del agua en lugar de predecir la calidad del agua.

Los resultados del análisis estadístico se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Análisis de regresión múltiple para determinar los factores que contribuyen con Índice de calidad del Agua (ICA).

Parámetros	Coefficiente β	Error Típico (ET)	β Estandarizado	Posición	t student's	Valor p
(Constante)	-39.477	0.487			-81.102	<0.001a
pH	6.373	0.084	0.053	IV	76.024	<0.001a
CE	0.005	0.001	0.007	VIII	5.905	<0.001a
Fe	9.417	0.436	0.011	VII	21.614	<0.001a
Mn	-31.618	0.434	0.04	V	72.895	<0.001a
Na	0.017	0.003	0.003	X	5.107	<0.001a
NO ₂	2.104	0.01	0.105	III	217.646	<0.001a
NO ₃	0.136	0.004	0.014	VI	32.413	<0.001a
SO ₄	0.02	0.005	0.002	XI	3.731	<0.003a
Cl	0.025	0.003	0.006	IX	7.526	<0.001a
Fenol	6318.542	10.973	0.332	II	575.81	<0.001a
CF	0.126	0	0.95	I	1919.101	<0.001a

a Altamente significativo

Los once parámetros considerados para la evaluación del ICA están contribuyendo significativamente con el ICA. Los CF, el fenol y los nitritos presentan los valores más altos de los pesos de los β estandarizados y tienen una marcada influencia en el índice de calidad del agua en el área de Maturín. Para el resto de los parámetros de calidad del agua, aunque estadísticamente significativo ($p < .001$), su contribución al ICA es insignificante en comparación con CF, Fenol y nitritos, basado en el coeficiente β estandarizado obtenido del análisis de regresión múltiple realizado para definir el ICA. La mala calidad del agua de Maturín se puede determinar en orden por CF, Fenol y nitritos. Este estudio brinda una visión general de la calidad del agua potable de aguas subterráneas en esta zona. La identificación de los indicadores de calidad del agua ayudaría a concentrarse en pocos elementos (atributos) durante un estudio (el chequeo) regular de la calidad del agua; por lo tanto, solo se determinarían los parámetros de CF, Fenol y nitritos. Esto ahorra tiempo, energía y gasto en gran medida sin comprometer la calidad de los resultados.

La Tabla 6 muestra el resumen del modelo del ICA. El valor R^2 ajustado es alto y el cuadrado medio residual es bajo para el modelo. Los coeficientes de regresión derivados no son cero ni menos que el error estándar. Para un modelo, el R^2 ajustado aumenta si la adición de la variable reduce el cuadrado medio residual. Además de esto, no es bueno retener variables insignificantes, es decir, variables con coeficientes cero o coeficientes menores que sus correspondientes errores estándar (Montgomery, et al., 2003).

Tabla 6. Análisis de varianza del modelo de regresión múltiple.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	338160.39	11	30741.854	1157469	0.000
Residuo	0.319	12	0.027		
Total (Corr.)	338,160.71	23			
R-cuadrado=99.9997 porcentaje					
R-cuadrado(ajustado para g.l)=99.9995 porcentaje					
Error estándar de est.=0.278912					
Error absoluto medio=0.16287					
Estadístico de Durbin-Watson=2.455 (P=0.0294)					
Autocorrelación residual en Lag1=-0.231793					

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 99.9997% de la variabilidad en el ICA. El estadístico R-cuadrado ajustado, que es más conveniente para comparar modelos con diferentes números de variables independientes, es 99.9995%. El error estándar de la estimación muestra la desviación típica de los residuos que es 0.278912. Este valor puede usarse para construir los límites de predicción para las nuevas observaciones. El error absoluto medio (MAE) de 0.16287 es el valor medio de los residuos. El estadístico Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en que se introdujeron los datos en el fichero. Dado que el p-valor es inferior a 0.05, hay indicio de una posible correlación serial. Para decidir la simplificación del modelo, se tomó en cuenta que el p-valor más alto en las variables independientes fue 0.003, perteneciendo a SO₄. Puesto que el p-valor es inferior a 0.01, ese término es estadísticamente significativo para un nivel de confianza del 99%. Por lo tanto, no vale la pena quitar ninguna variable del modelo.

Por último, los coeficientes de regresión del modelo para la ecuación ICA se muestran a continuación:

$$ICA = -39.477 + 6.373 * pH + 0.005 * CE (\mu S/cm) + 9.417 * Fe (mg/l) + 31.618 * Mn (mg/l) + 0.017 * Na (mg/l) + 2.104 * NO_2 (mg/l) + 0.136 * NO_3 (mg/l) + 0.02 * SO_4 (mg/l) + 0.025 * Cl (mg/l) + 6318.54 * Fe-nol (mg/l) + 0.126 * CF (NMP/100ml)..... (3).$$

El análisis de varianza (ANOVA) para el modelo indicó que el valor observado F fue 1,1157,469 para ICA, mientras que el valor crítico de tabla F (0.01, 11, 12) fue 4.23, revelando que el valor observado es muchas veces mayor que el valor crítico. Para que un modelo de regresión sea útil como predictor, la relación F observada debe ser al menos cuatro o cinco veces mayor que el valor crítico de F, como lo señalan Montgomery y otros (2003).

Gupta y Roy (2012), para aguas subterráneas en una zona minera de la India, reportan una ecuación múltiple con 9 parámetros fisicoquímicos (arsénico, magnesio, dureza, COD, turbidez, dureza total, BOD, DO, nitrato y sulfato). Mientras Pius y otros (2012), también para aguas subterráneas en una zona industrial al sur de la India, definen una ecuación con pH, alcalinidad, TDS, Ca, Mg, cloruro, sulfato y nitrato como variables independientes (o predictores).

CONCLUSIONES

La mayor fuente de contaminación de los acuíferos de Maturín la constituyen las descargas residuales con altos valores de coliformes fecales infiltrados, producto de una mala disposición de sus desechos fecales (pozos sépticos, napas freáticas y otros) y de las actividades pecuarias de esta zona. En segundo lugar, se ubican las actividades de la industria petrolera y la agricultura, en las cuales se identifican a los parámetros de fenoles y NO_3 como las mayores cargas de contaminación.

Los ACP dieron como resultado seis factores que explicaron el 86.57% de la varianza acumulada en el conjunto de datos. El primer factor explicó el 36.48% de la varianza acumulada; el segundo factor, el 14.56%; el tercer factor, el 12.58%; el cuarto, el 9.72%; el quinto, el 7.24%; y por último, el sexto, el 5.99% de las varianzas acumuladas.

Los resultados del análisis de regresión lineal múltiple (RLM) revelan que pH, CE, Fe, Mn, Na, NO_2 , NO_3 , SO_4 , Cl, Fenol y CF son los parámetros más importantes utilizados para evaluar los cambios en la calidad del agua subterránea. Los resultados anteriores muestran que el modelo APC-ARM proporciona una buena precisión para el pronóstico del ICA, donde el valor R^2 es 0.99 y el modelo indica que el 99.99% de variabilidad del ICA se explica por las once variables independientes utilizadas en el modelo. El análisis estadístico multivariado gestiona numerosos y complejos datos para disminuir el número de variables y proporcionar datos completos. En este estudio, los métodos estadísticos multivariantes se expresaron como bastante exitosos en la determinación de la calidad del agua. Numerosas variables fueron explicadas con un menor número de variables. Al mismo tiempo, estas variables proporcionaron información más útil sobre la calidad del agua subterránea del área de Maturín. Por lo tanto, esta técnica se puede aplicar con mucho éxito para la planificación y el seguimiento de la calidad en el futuro.

REFERENCIAS

- Ahmed, S., Hussain, M. y Abderrahman, W., 2005. Using multivariate factor analysis to assess surface/logged water quality and source of contamination at a large irrigation project at Al-Fadhli, Eastern Province, Saudi Arabia. En: *Bulletin of Engineering Geology and the Environment*, 64, pp.232–315. DOI: 10.1007/s10064-005-0277-6.
- Arumugam, K. y Elangovan, K., 2009. Hydrochemical characteristics and groundwater quality assessment in Tirupur Region Coimbatore District, Tamil Nadu, India. En: *Environ Geol*, 58, pp.1509–1520. <https://doi.org/10.1007/s00254-008-1652-y>

- Azaza, F.H., Ketata, M., Bouhlila, R., Gueddari, M. y Riberio, L., 2011. Hydrogeochemical characteristics and assessment of drinking water quality in Zeuss-Koutine aquifer, southeastern Tunisia. En: *Environ Monit Assess*, 174, pp.283–298. <https://doi.org/10.1007/s10661-010-1457-9>
- Azkue, M. y Soto, E., 2004. Régimen de precipitación en Montalbán, Estado Carabobo, Venezuela. 2004. En: *Agronomía Tropical*, 54(4), pp.359-370.
- Beita-Sandí, W. y Barahona-Palomo, M., 2010. Físico-química de las aguas superficiales de la Cuenca del río Rincón, Península de Osa, Costa Rica. En: *Cuadernos de Investigación UNED*, 2(2), pp.157-179.
- Belkhi, L., Boudoukha, A., Mouni, L. y Baouz, T., 2010. Multivariate statistical characterization of groundwater quality in Ain Azel plain, Algeria. En: *African Journal of Environmental Science and Technology*, 4(8), pp.526-534.
- Benítez, S., 2004. *Determinación de la carga orgánica impuesta al río Manzanares en el periodo febrero-junio 2004*. Cumaná: IUT. (Trabajo de Grado).
- Boyacioglu, H., 2006. Surface water quality assessment using factor analysis. En: *Water S.A.*, 32(3), pp.389–393. DOI: 10.4314/wsa.v32i3.5264.
- Calla, L.H. y Cabrera, C.C., 2010. Calidad del agua en la cuenca del río Rímac, sector de San Mateo, afectado por las actividades mineras. En: *Revista del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Geología, Minas, Metalurgia y Ciencias Geográficas*, 13(25), pp.87-94.
- Cai, W.J., Guo, X.H., Chen, C.T.A., Dai, M.H., Zhang, L.J., Zhai, W.D., Lohrenz, S.E. y Yin, K., 2007. A comparative overview of weathering intensity and HCO₃ flux in the world's major rivers with emphasis on the Changjiang, Huanghe, Zhujiang (Pearl) and Mississippi Rivers. En: *Cont. Shel. Res.*, 28(12), pp.1538-1549. DOI: 10.1016/j.csr.2007.10.014.
- Cansu Filik Iscen, Özgür, Emiroglu, Semra Ilhan, Naime, Arslan, Veysel, Yilmaz y Seyhan, Ahiska, 2008. Application of multivariate statistical techniques in the assessment of surface water quality in Uluabat Lake, Turkey. En: *Environ Monit Assess*, 144(1-3), pp.269–276. DOI: 10.1007/s10661-007-9989-3.
- Cardona, A., Carrillo-Rivera, J., Huizar-Alvarez, R. y Graniel-Castro, E., 2004. Salinization in coastal aquifer sofarid zones: an example from Santo Domingo, Baja California Sur, México. En: *Environmental Geology*, 45, pp.350-366. <https://doi.org/10.1007/s00254-003-0874-2>

- Chávez-Alcántar, A.L., Velázquez-Machuca, M., Pimentel-Equihua, J.L., Venegas-González, J., Montañez-Soto, J.L. y Vázquez-Gálvez, G., 2011. Hidroquímica de las aguas superficiales de la Ciénega de Chapala e índice de calidad de agua. *En: Terra Latinoamericana*, 29(1), pp.13.
- Díaz, A., Rincón, N., Marín, J., Behling, E., Chacin E. y Fernández N., 2005. Degradación de fenoles totales durante el tratamiento biológico de aguas de producción petroleras. *En: Ciencia*, 13(3), pp.281-291.
- Duran, Liliana, 2011. Las políticas hídricas en Venezuela en la gestión del agua subterránea. *En: Revista Voces: Tecnología y Pensamiento*, 5(1-2), pp.93-106.
- Gil, J., 2003. *Recursos hidrogeológicos* [En línea]. [s.l.]: [s.n.]. [Consulta 11 de mayo de 2015]. Disponible en: <http://pdfhumanidades.com/sites/default/files/apuntes/recursos.pdf>
- Gil Marín, José Alexander, Lozada García, Beatriz I., López Pérez, Nadiezhda, Márquez, Luis y Del Valle Salazar Gil, Marielin, 2012. Evidencias de la variabilidad y cambios climáticos en Maturín, estado Monagas, Venezuela. *En: Revista Científica UDO Agrícola*, 12(2), pp.389-399.
- Gil Marín, José Alexander, Vizcaíno, G.C. y Montañó-Mata, Nelson. P.D., 2018. Evaluación de la calidad del agua superficial utilizando el índice de calidad del agua (ICA). Caso de estudio: cuenca del Río Guarapiche, Monagas, Venezuela. *En: Anales Científicos*, 79(1), pp.111-119.
- Gordon, G.E., 1988. Receptor models. *En: Environ. Sci. Technol.*, 22, pp.1132-1142.
- Grivas, G. y Chaloulakou, A., 2006, Artificial neural net-work models for prediction of PM10 hourly concentrations, in the Greater area of Athens, Greece. *En: Atmos. Environ.*, 40(7), pp.1216-1229. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2005.10.036>
- Guo, H. y Wang, Y., 2004. Hydrogeochemical processes in shallow quaternary aquifers from the northern part of the Datong Basin, China. *En: Applied Geochemistry*, 19, pp.19-27. [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(03\)00128-8](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(03)00128-8)
- Gupta, P. y Roy, S., 2012. Evaluation of spatial and seasonal variations in groundwater quality at Kolar Gold Fields, India. *En: American Journal of Environmental Engineering*, 2(2), pp.19-30. DOI: 10.5923/j.ajee.20120202.04.
- Helena, B., Pardo, R., Vega, M., Barrado, E., Fernández, J.M. y Fernández, J., 2000. Temporal evolution of groundwater composition in an alluvial aquifer (Pisuerga River, Spain) by principle component analysis. *En: Wat. Res.*, 34(3), pp.807-816. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00225-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00225-0)

Holland, M. y Witthuser, K.T., 2009. Geochemical characterization of karst groundwater in the Cradle of Humankind World Heritage Site, South Africa. En: *Environmental Geology*, 57, pp.513-524.
<https://doi.org/10.1007/s00254-008-1320-2>

Instituto Nacional de Estadística, 2011. *XIV Censo nacional de población y vivienda resultados por entidad federal y municipio del Estado Monagas*. Caracas: INE. 97 pp.

Jin, Z., Chen, Y., Wang, F. y Ogura, N., 2004. Detection of nitrate sources in urban groundwater by isotopic and chemical indicators, Hangzhou City, China. En: *Environmental Geology*, 45(7), pp.1017-1024.
DOI: 10.1007/s00254-004-0962-y.

Kaiser, H.F., 1960. The application of electronic computers to factor analysis. En: *Educational and Psychological Measurement*, 20(1), pp.141-151.
<https://doi.org/10.1177/001316446002000116>

Kanade, S.B. y Gaikwad, V.B., 2011. A multivariate statistical analysis of bore well chemistry data - Nashik and Niphad Taluka of Maharashtra, India. En: *Universal Journal of Environmental Research and Technology*, 1(2), pp.193-202.

Karim, Zare y Abdolrahman, Rasekh, 2011. Diagnostic measures for linear mixed measurement error models. En: *Statistics and Operations Research Transactions*, 35(2), pp.125-144.

Krishna, A.K., Satyanarayanan, M. y Govil, P.K., 2009. Assessment of heavy metal pollution in water using multivariate statistical techniques in an industrial area: A case study from Patancheru, Medak District andhraPradesh, India. En: *J. Hazardous Materials*, 167(1-3), pp.366-373. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.12.131>

Liu, C.W., K.H. Lin y Kuo, Y.M., 2003. Application of factor analysis in the assessment of groundwater quality in a black foot disease area in Taiwan. En: *The Science of the Total Environ.*, 313(1-3), pp.77-89. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00683-6](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00683-6)

Memet, Varol y Büilent, Sen, 2009. Assessment of surface water quality using multivariate statistical techniques: a case study of Behrimaz Stream, Turkey. En: *EnvironMonitAssess*, 159, pp.543-553. <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0650-6>

Ministerio del Poder Popular del Ambiente, 2009. *Plan nacional de gestión integral de las aguas*. Caracas: MPPA. 200p.

- Mishra, P.C., Behera, P.C. y Patel, R.K., 2005. Contamination of water due to major industries and open refuse dumping in the steel city of Orissa—a case study. En: *J Environ Sci Eng*, 47(2), pp.141–154.
- Mohd, Fahmi, Mohd, Nasir, Mohd, Saiful, Samsudin, Isahak, Mohamad, Mohammad, Roshide, Amir, Awaluddin, Muhd, Ariffin, Mansor, Hafizan, Juahir y Norlaffah, Ramli, 2011. River water quality modeling using combined principle component analysis (PCA) and multiple linear regressions (MLR): a case study at Klang River, Malaysia. En: *World Applied Sciences Journal*, 14, (Exploring Pathways to Sustainable Living in Malaysia: Solving the Current Environmental Issues), pp.73-82.
- Montgomery, D.C., Peck, E.A. y Vining, G.G., 2003. *Introduction to linear regression analysis*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Nádaská, G., Lesný, J. y Michalík, I., 2010. Environmental aspect of manganese chemistry. En: *Hungarian Journal of Sciences*, ENV-100702-A, pp.1-16.
- Nieves, K., Riera, A., Vega, C. y Manganiello, L., 2005. Desarrollo de sistemas de manipulación de muestras para la determinación de fenol y pentaclorofenol en agua potable. En: *Revista Ingeniería UC*, 22(2), pp.88.
- Ntengwe, F.W., 2006. Pollutant loads and water quality in streams of heavily populated and industrialised towns. En: *Physics and Chemistry of the Earth*, 31, pp.832–839. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2006.08.025>
- Organización Mundial de la Salud, 2006. *Guías para la calidad del agua potable. Primer apéndice a la tercera edición. Volumen 1. Recomendaciones*. Ginebra: OMS. 393p.
- Ouyang, Y., Nkedi-Kizza, P., Wu, Q.T., Shinde, D. y Huang, C.H., 2006. Assessment of seasonal variations in surface water quality. En: *Water Research*, 40, pp.3800–3810. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.08.030>
- Pazand, K., Hezarkhani, A., Ghanbari, Y. y Aghavali, N., 2012. Geochemical and quality assessment of groundwater of Marand Basin, East Azarbaijan Province, Northwestern Iran. En: *EnvironEarthSci*, 67, pp.1131–1143. DOI: 10.1007/s12665-012-1557-7.
- Pius, A., Jerome, C. y Nagaraja, S., 2012. Evaluation of groundwater quality in and around Peenya industrial area of Bangalore, South India using GIS techniques. En: *EnvironMonitAssess*, 184(7), pp.4067–4077. doi: 10.1007/s10661-011-2244-y.
- Porras, J., Nieto López-Guerrero, Pedro, Álvarez-Fernández, Ceferino, Fernández Uría, Antonio y Gimeno, María Victoria, 1985. *Calidad y contaminación de las aguas subterráneas en España*. Madrid: Instituto Geológico y Minero de España.

- Saima, S., Osman, R., Spian, D.R.S.A, Jaafar, M.Z., Juahir, H., Abdullah, M.P. y Ghani, F.A., 2009. Chemometric approach to validating faecal sterols as source tracer for faecal contamination in water. En: *Water Res.*, 43, pp.5023-5030. DOI: 10.1016/j.watres.2009.08.052.
- Sarbu, C. y Pop, H.F., 2005. Principal component analysis versus fuzzy principal component analysis a case study: the quality of danube water (1985–1996). En: *Talanta*, 65, pp.1215-1220. doi: 10.1016/j.talanta.2004.08.047
- Shrestha, S. y Kazama, F., 2007. Assessment of surface water quality using multivariate statistical techniques: A case study of the Fuji river basin; Japan. En: *Environmental Modelling & Software*, 22, pp.464–475. <https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2006.02.001>
- Simge, Varol y Aysen, Davraz, 2014. Evaluation of the groundwater quality with WQI (Water Quality Index) and multivariate analysis: a case study of the Tefenniplain(Burdur/Turkey). En: *Environmental Earth Sciences*, 73(4), pp.1725–1744. <https://doi.org/10.1007/s12665-014-3531-z>
- Zare Garizi, A., Sheikh, V. y Sadoddin, A., 2011. Assessment of seasonal variations of chemical characteristics in surface water using multivariate statistical methods. En: *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 8(3), pp.581-592. https://link.springer.com/article/10.1007%2F978-94-007-3326-2_44
- Venezuela. Decreto 883.1995, de 11 de octubre de 1995. *Gaceta Oficial Extraordinaria*, 18 de diciembre de 1995, No 5.021.
- Villa, A.M.A., 2011. *Evaluación de la calidad del agua en la subcuenca del río Yacuambi. Propuestas de tratamiento y control de la contaminación*. Cádiz: Departamento de Química Analítica. (Tesis de Máster).
- Wunderlin, D.A., Diaz, M.P., Ame, M.V., Pesce, S.F., Huedy, A.C. y Bistoni, M.A., 2001. Pattern recognition techniques for the evaluation of spatial and temporal variations in water quality. A case study: Suquia river basin (Cordoba, Argentina). En: *Water Res.*, 35, pp.2881-2894. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00592-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00592-3)

Implementación de la datación mediante ^{210}Pb - ^{137}Cs en Uruguay para el reconocimiento de la variabilidad climático-ambiental del Holoceno superior. Caso de estudio: Laguna de las Nutrias, Rocha, Uruguay

Dating through ^{210}Pb - ^{137}Cs implementation in Uruguay in the recognition of climatic-environmental variability of the upper Holocene. Case study: Laguna de las Nutrias, Rocha, Uruguay

Implementação da datação através de ^{210}Pb - ^{137}Cs no Uruguai para o reconhecimento da variabilidade climático-ambiental do alto Holoceno. Estudo de caso: Laguna de las Nutrias, Rocha, Uruguay

RECIBIDO: 30/3/2020 → APROBADO: 28/5/2020 ✉ german.azcune@gmail.com

✉ AZCUNE, GERMÁN (1); PÉREZ PARADA, ANDRÉS (1); FORNARO, LAURA (1)

(1) GRUPO DE DESARROLLO DE MATERIALES Y ESTUDIOS AMBIENTALES, DEPARTAMENTO DE DESARROLLO TECNOLÓGICO, CENTRO UNIVERSITARIO REGIONAL DEL ESTE, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, URUGUAY

RESUMEN

La geocronología constituye una herramienta fundamental para el estudio de eventos históricos. Su desarrollo en Uruguay se ha vinculado estrechamente con estudios arqueológicos. En los últimos 20 años, las técnicas de datación se han expandido hacia otras disciplinas, propiciando cambios y mejoras metodológicas. El método mayormente utilizado para estudiar la cronología de eventos climáticos y ambientales más recientes del Holoceno es el de ^{210}Pb - ^{137}Cs . El objetivo del presente trabajo es el desarrollo en Uruguay del método geocronológico de ^{210}Pb - ^{137}Cs y su aplicación a un caso de estudio. Para ello, se tomó un testigo vertical de sedimento en la Laguna de las Nutrias (Rocha), que fue submuestreado, y las secciones fueron medidas por espectrometría gamma, determinando los radionucleidos ^{210}Pb , ^{226}Ra y ^{137}Cs .

La concentración de ^{210}Pb fue modelada matemáticamente, encontrándose que el modelo de mejor ajuste es el de flujo constante. Este modelo fue corroborado positivamente contra el perfil histórico de actividad de ^{137}Cs procedente de eventos nucleares. Se determinó la tasa de sedimentación anual, siendo de 3.1 ± 1.5 mm/año⁻¹, desde 1870 a 1986 AD; y de 4.7 ± 0.8 mm/año⁻¹, de 1986 AD hasta el presente. Asimismo, se infirió un evento extremo posiblemente asociado a la variabilidad climática inherente a la pequeña edad del hielo.

PALABRAS CLAVE: geocronología, sedimentación, paleolimnología.

ABSTRACT

Geochronology constitutes a fundamental tool for the study of historical events. Its development in Uruguay has been closely linked with archaeological studies. In the last 20 years, dating techniques have expanded into other disciplines, leading to methodological changes and improvements. The most widely used method to study the chronology of most recent Holocene climatic and environmental events is ^{210}Pb - ^{137}Cs . The objective of this manuscript is the development in Uruguay of the ^{210}Pb - ^{137}Cs geochronological method and its application to a study case. For this, a vertical sediment core was taken from Laguna de las Nutrias (Rocha), which was sub-sampled, and the sections were measured by gamma spectrometry, determining the ^{210}Pb , ^{226}Ra and ^{137}Cs radionuclides. The ^{210}Pb concentration was mathematically modeled, finding that the best fit model is the constant rate of supply model. This model was positively corroborated against the historical profile of ^{137}Cs activity from nuclear events. The annual sedimentation rate was calculated to be 3.1 ± 1.5 mm/year⁻¹ from 1870 to 1986 AD and 4.7 ± 0.8 mm.year⁻¹ after 1986 AD. Likewise, an extreme event possibly associated to the inherent climatic variability of Little Ice Age was inferred.

KEY WORDS: geochronology, sedimentation, paleolimnology.

RESUMO

A geocronologia constitui uma ferramenta fundamental para o estudo de eventos históricos. Seu desenvolvimento no Uruguai está intimamente ligado a estudos arqueológicos. Nos últimos 20 anos as técnicas de datação expandiram-se para outras disciplinas, promovendo mudanças e melhorias metodológicas. O método mais utilizado para estudar a cronologia de eventos climáticos e ambientais mais recentes do Holoceno é o ^{210}Pb - ^{137}Cs . O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento no Uruguai do método geocronológico ^{210}Pb - ^{137}Cs e sua aplicação em um estudo de caso. Para isso, foi coletado um testemunho vertical de sedimentos na Laguna de las Nutrias (Rocha), o qual foi subamostrado, e as seções foram medidas por espectrometria gama, determinando os radionuclídeos ^{210}Pb , ^{226}Ra e ^{137}Cs . A concentração de ^{210}Pb foi modelada matematicamente, constatando que o melhor modelo de ajuste é o modelo de fluxo constante. Este modelo foi corroborado positivamente contra o perfil histórico da atividade de ^{137}Cs de eventos nucleares. A taxa anual de sedimentação foi determinada, sendo de $3,1 \pm 1,5$ mm/ano⁻¹, de 1870 a 1986 dC,

e $4,7 \pm 0,8$ mm/año⁻¹, de 1986 dC até o presente. Da mesma forma, um evento extremo foi inferido possivelmente associado à variabilidade climática inerente à pequena edad de hielo.

PALAVRAS CHAVE: geocronología, sedimentação, paleolimnología.

INTRODUCCIÓN

Dos son los conceptos fundamentales sobre los que se apoya la percepción del tiempo: la duración y la sucesión. La duración es el intervalo entre un acontecimiento y otro, mientras que la sucesión distingue entre diferentes acontecimientos, dándoles un orden. En la cultura occidental el tiempo es percibido como algo lineal e irreversible. Mediante la mecanización del tiempo se establece la medida del mismo, dando la noción de que está dividido en fracciones de igual duración (Puente, 2005). En este marco, la geocronología es una herramienta fundamental para el estudio de eventos históricos o sucesiones de eventos. Si bien en Uruguay el desarrollo de la geocronología se vincula estrechamente con los estudios arqueológicos, en los últimos 20 años, las técnicas de datación se han expandido a otras disciplinas científicas como las ciencias ambientales o el estudio del cambio climático. La interdisciplina ha hecho propicia la mejora metodológica de las técnicas de datación, así como la aplicación de nuevas técnicas, adecuadas para otras matrices y otros rangos temporales.

Los primeros fechados realizados sobre muestras del Uruguay fueron mediante ^{14}C , alrededor de 1980 (Baeza, et al., 1977; Baeza, 1985). Más del 80% de los trabajos de Uruguay en los que se emplea geocronología utiliza esta metodología (Azcune, et al., 2019), siendo asociados en su mayoría a datos arqueológicos de registros prehispánicos.

Para la cronología de eventos recientes, donde se pretende estudiar, por ejemplo, la influencia antropogénica en un cuerpo de agua, el método más utilizado es el de ^{210}Pb - ^{137}Cs (Madella, et al., 1998). Debido a su rango dinámico, que abarca únicamente los últimos 150 años (Ivanovich y Harmon, 1992), el método comenzó a utilizarse en Uruguay en 2002 (García-Rodríguez, et al., 2002) en el estudio de eventos recientes, tanto climáticos como ambientales.

El ^{210}Pb es un isótopo inestable del Pb y pertenece a la serie de decaimiento natural del ^{238}U . El mismo presenta un período de semidesintegración ($t_{1/2}$) de 22.20 años, decayendo por β^- a ^{210}Bi , y presentando una emisión γ asociada de 46.539 keV con 4.25% de probabilidad de ocurrencia (Shamsuzzoha Basunia, 2014). Si bien en sistemas cerrados la serie de decaimiento del ^{238}U debería estar en equilibrio, en sistemas abiertos este equilibrio se rompe por el escape a la atmósfera del ^{222}Rn , gaseoso. El ^{222}Rn , radionucleido de $t_{1/2}=3.8$ días, ya en la atmósfera, decae de manera sucesiva a través de varios radionucleidos a ^{210}Pb , el cual se asocia con aerosoles, precipitándose con la lluvia en zonas continentales y alojándose por escorrentía en el sistema sedimentario reciente de sistemas continentales lénticos u oceánicos.

El ^{210}Pb alojado en el sedimento proviene de dos fuentes: 1) del equilibrio del ^{238}U en el sedimento, y más precisamente del equilibrio del ^{226}Ra , con el que alcanza un

equilibrio secular. A este ^{210}Pb se le asigna la nomenclatura ^{210}Pb base ($^{210}\text{Pb}_{\text{base}}$). 2) El ^{210}Pb depositado por precipitación pluvial es adsorbido en partículas suspendidas en la columna de agua y posteriormente sepultado en el fondo lagunar. A este ^{210}Pb se lo denomina ^{210}Pb en exceso ($^{210}\text{Pb}_{\text{ex}}$) (Crusius y Anderson, 1995). El ^{210}Pb base, al encontrarse en equilibrio secular con el ^{226}Ra , radionucleido de $t_{1/2}=1600$ años, puede ser considerado constante a escala anual o decadal (Rink y Thompson, 2015). En cambio, la actividad del ^{210}Pb en exceso se encuentra sujeta a su decaimiento radioactivo, permitiendo calcular la fecha de sedimentación al evaluar la desintegración radioactiva en función de la profundidad.

Los principios del método de ^{210}Pb han sido propuestos en 1963 y 1964 (Goldberg, 1963; Crozaz, et al., 1964) para muestras de nieve en la Antártida, adaptándose la técnica para sedimentos lacustres en 1971 (Krishnaswamy, et al., 1971) y marinos en 1972-1973 (Koide, et al., 1972; Koide, et al., 1973).

Pese a que se trata de una técnica ampliamente utilizada, la misma asume que el proceso de sedimentación sigue un modelo conocido y que no ocurren procesos de transformación post-depositacional del ^{210}Pb en exceso. Dichas suposiciones, en caso de ser cumplidas en mayor o menor medida, pueden derivar en edades certeras (Hu, et al., 2018), o totalmente erróneas (Tylmann, et al., 2016). Esto deriva en la necesidad de validar el modelo de datación obtenido por ^{210}Pb con un método de datación diferente u otras fuentes de información complementarias (Chang, et al., 2017). Por este motivo, se utiliza el método ^{210}Pb - ^{137}Cs en lugar de emplear únicamente el método de ^{210}Pb , ya que el ^{137}Cs , de origen antrópico, podrá confirmar o contradecir el modelo de edad obtenido mediante el modelo de ^{210}Pb . Por su parte, el ^{137}Cs es producido por fisión nuclear, presenta un decaimiento β^- a ^{137}Ba , con un $t_{1/2}=30.08$ años, y su aparición en sedimentos se debe al *fall out* en el planeta. Dicho *fall out* se ha originado por el vertido a la atmósfera de eventos nucleares armamentistas (bombas o ensayos) o pacíficos (accidentes de reactor u otros), cuyos acontecimientos principales son de fecha conocida.

El objetivo de este trabajo es el desarrollo en Uruguay de la metodología para realizar geocronología mediante ^{210}Pb - ^{137}Cs , y su aplicación a un caso de estudio nacional. Estas capacidades metodológicas son de gran importancia para las ciencias ambientales, ya que permiten evaluar la evolución histórica de distintos sistemas ambientales en el pasado reciente. Hasta el presente trabajo, en Uruguay, todas las cronologías que utilizaron esta metodología en sistemas sedimentarios fueron realizadas en laboratorios extranjeros, tales como: Laboratorio de Química Inorgánica Marina, Instituto Oceanográfico, Universidad de San Pablo, Brasil (Bueno, et al., 2018), Bremen State Radioactivity Measurements Laboratory, Alemania (Marrero, et al., 2014), UFZ Centre for Environmental Research, Alemania (García-Rodríguez, et al., 2002).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

El muestreo fue realizado en febrero de 2018 en la Laguna de las Nutrias, Rocha, Uruguay (Figura 1), laguna natural de 33.8 ha de área, con una cuenca de 44.7 ha y una profundidad máxima de 1.5 m. Se trata de una laguna somera, de agua dulce y turbia, desarrollada sobre depósitos de la Formación Laguna Merín, con

un alto nivel de eutrofización según sus niveles de nitrógeno y fósforo (Kruk, et al., 2006, 2009). La elección de este sistema léntico se basa en sus características sedimentológicas e hidrodinámicas, la cuales aseguran la decantación y ausencia de mezcla de sedimentos (al no contar con afluentes, solamente incorpora agua mediante precipitación pluvial y escorrentía). Asimismo, la laguna está alejada de actividades antrópicas de gran porte que generen perturbaciones de importancia (Sánchez-Cabeza, et al., 2012). Se tomó un testigo vertical de sedimento de 65 cm de longitud en la zona de mayor profundidad y libre de colonización masiva de macrófitas de la laguna, de forma manual, empleando para ello un tubo de cloruro de polivinilo (PVC) de 150 mm de diámetro interno (coordenadas de muestreo $34^{\circ}40'50.8''$ S, $54^{\circ}17'42.0''$ O). Se inmovilizó la interfase agua-sedimento mediante el empleo de espuma fenólica saturada en agua (espuma floral) previo al sellado, y se dispuso la columna de sedimento de forma horizontal, de manera de evitar la compactación y movimiento de agua intersticial (García-Rodríguez, 2002). El testigo de sedimento fue almacenado a 4°C hasta el momento de su apertura.



Figura 1. Localización de la Laguna de las Nutrias en la costa uruguaya (cotas imagen: $34^{\circ}34'22''\text{S}$ $54^{\circ}31'30''\text{O}$ – $34^{\circ}47'00''\text{S}$ $54^{\circ}07'07''\text{O}$)

Preparación de muestra

El testigo fue abierto de manera longitudinal, y luego fraccionado de forma transversal cada 1 cm, desde la superficie hasta los 30 cm de profundidad, y cada 2 cm, desde los 30 cm hasta el final (Figura 2).



Figura 2. Apertura de testigo de sedimento y submuestreo

Cada sección de sedimento fue secada a 60°C hasta masa constante (aproximadamente 48 h), molida en molino Micro-Mill de Bel-Art™ SP Scienceware™ hasta un tamaño menor a $125\mu\text{m}$, y sellada en placas Petri de $35\text{mm} \times 10\text{mm}$ por al menos 4 semanas, para así alcanzar el equilibrio secular de las series naturales del ^{238}U y ^{232}Th .

Determinación de radionucleidos

Para la determinación de los radionucleidos ^{210}Pb , ^{226}Ra y ^{137}Cs , las muestras fueron medidas por 150.000 segundos cada una, con un tiempo muerto que varió desde 0.1 a 0.4%. Para ello se utilizó un sistema de espectrometría gamma con detector de germanio de alta pureza (HPGe) ORTEC GMX35P4-76-RB acoplado al sistema de espectrometría Gamma DSPEC jr. ORTEC-AMETEK. Para la calibración en eficiencia fue utilizado el patrón IAEA 385 – Irish Sea Sediment, preparado y medido en las mismas condiciones que la muestra. El ^{210}Pb fue estudiado mediante su fotopico de 46.54 keV, el ^{226}Ra mediante el fotopico del ^{214}Pb de 351.93 keV, y el ^{137}Cs mediante el fotopico del ^{137}Ba de 661.66 keV.

Análisis de datos

La concentración de ^{210}Pb fue modelada matemáticamente mediante el modelo de actividad constante o concentración inicial constante (CIC – Constant Initial Concentration) (Robbins y Edgington, 1975) y el modelo de flujo constante (CRS - Constant Rate of Supply) (Appleby y Oldfield, 1978). Para la realización de dichos modelos matemáticos se utilizó el software Microsoft® Excel® para Office 365 MSO (16.0.12527.20260) 32 bits.

Modelo de concentración inicial constante – CIC

Este modelo supone como hipótesis una concentración inicial (C_0) de depósito del $^{210}\text{Pb}_{\text{ex}}$ constante, con lo cual la concentración de actividad de cualquier sección i (C_i) se calculará mediante la ley de desintegración radiactiva como:

$$C_i = C_0 \times e^{-\lambda t} \quad \text{con} \quad \lambda = \ln(2)/t_{1/2} \quad \text{siendo} \quad t_{1/2} = 22.2 \text{ años para el } ^{210}\text{Pb}$$

Por lo tanto, la edad de cada sección puede calcularse como:

$$t_i = (1/\lambda) \times \ln (C_0/C_i)$$

Modelo de flujo constante - CRS

Este modelo tiene como hipótesis un flujo constante, es decir que la cantidad de $^{210}\text{Pb}_{\text{ex}}$ anual por área es la misma. Se define la actividad acumulada específica por unidad de área A_i como:

$$A_i = \int_i^\infty (C_i/S) di \text{ con } S \text{ como la sección del testigo}$$

De forma análoga a CIC, la edad de cada sección se puede calcular como:

$$t_i = (1/\lambda) \times \ln (A_0/A_i)$$

RESULTADOS

Actividad específica de los radionucleidos

La actividad específica de ^{210}Pb y ^{226}Ra para cada una de las secciones, calculada en base a la masa de sedimento medida, a la corrección por autoabsorción y a la eficiencia del detector, es presentada en la Figura 3. Para el cálculo de incertidumbres se tuvieron en cuenta las asociadas a la actividad radioactiva, que cumple con una distribución Poisson, tanto de las muestras como del ruido de fondo, así como las informadas para el patrón utilizado.

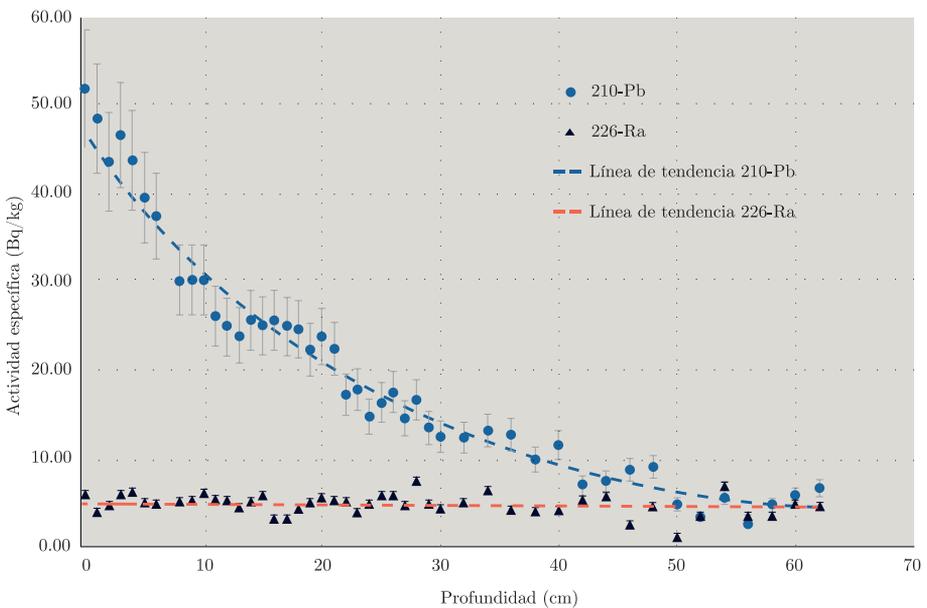


Figura 3. Distribución de actividad específica de ^{226}Ra y ^{210}Pb en relación a profundidad

La actividad específica del ^{226}Ra oscila en base a una actividad constante, ya que la misma depende únicamente del decaimiento radiactivo de la serie natural del ^{238}U . Para el ^{210}Pb , se observa un decaimiento exponencial con la profundidad, hasta valores de actividad de ^{210}Pb constantes, actuando en la parte exponencial el decaimiento radiactivo del ^{210}Pb depositado por precipitación pluvial (^{210}Pb en exceso). Podría afirmarse que la base constante constituye únicamente la actividad del ^{210}Pb proveniente del decaimiento de la serie del ^{238}U en el mismo sedimento (^{210}Pb base) (Sánchez-Cabeza, et al., 2012). Este comportamiento pseudo-constante a tiempos cortos se debe al equilibrio secular existente entre el ^{210}Pb y el ^{226}Ra encapsulado en el sedimento. Restando ambas contribuciones, puede calcularse la actividad del $^{210}\text{Pb}_{\text{ex}}$, la cual es presentada en la Figura 4 para todo el testigo.

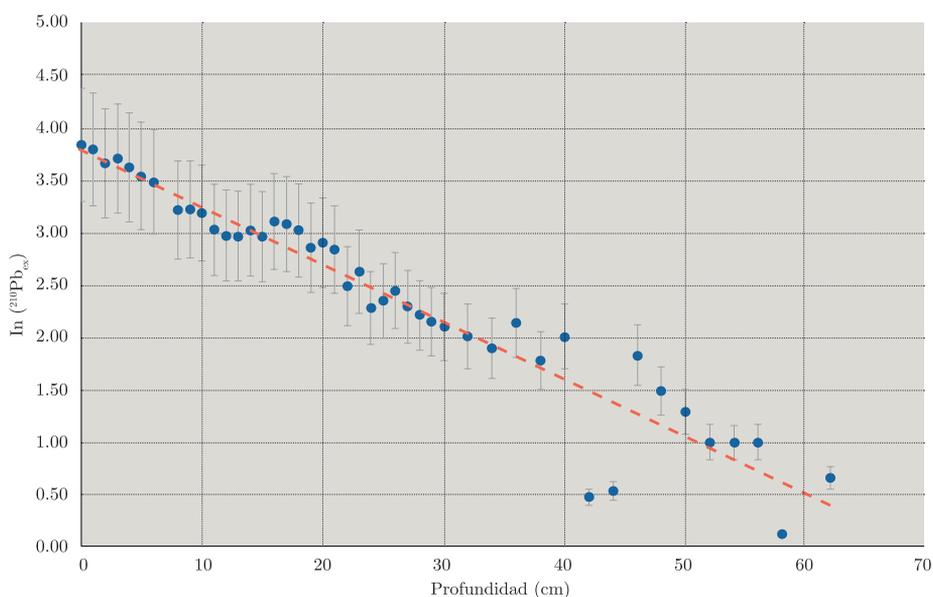


Figura 4. Distribución de logaritmo de actividad específica $^{210}\text{Pb}_{\text{ex}}$ en relación a la profundidad

Al igual que para la actividad específica de ^{210}Pb y ^{226}Ra , la actividad específica de ^{137}Cs para cada una de las secciones fue calculada en base a la masa de sedimento medida, la corrección por autoabsorción y la eficiencia del detector. La misma es presentada en la Figura 5.

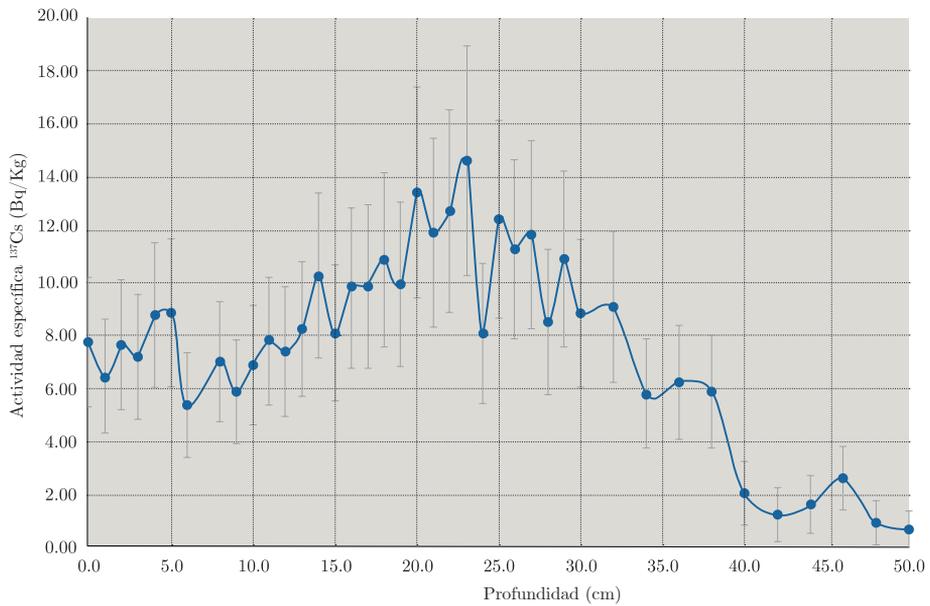


Figura 5. Distribución de actividad específica de ^{137}Cs en relación a profundidad

Modelado de la actividad del ^{210}Pb en exceso

Para el modelo CIC se hizo la suposición de concentración inicial constante de $^{210}\text{Pb}_{\text{ex}}$, presentándose en la Figura 6 un gráfico de la edad en relación a la profundidad.

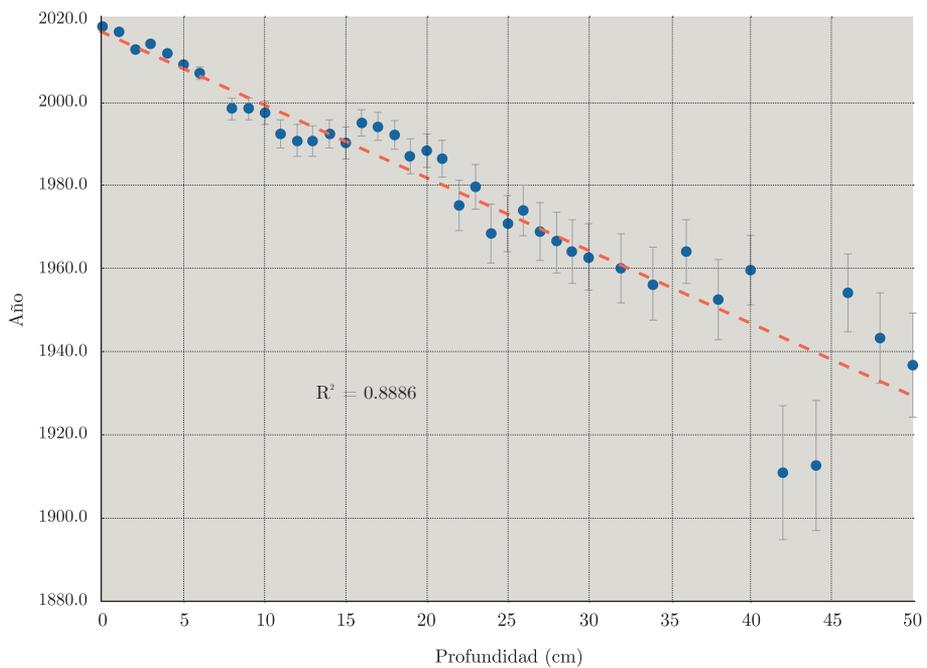


Figura 6. Datación por ^{210}Pb utilizando el modelo de concentración inicial constante (CIC)

Para el modelo CRS se hizo el supuesto de una cantidad de $^{210}\text{Pb}_{\text{ex}}$ anual por unidad de área constante, en la Figura 7 se presenta el gráfico de la edad en relación a la profundidad.

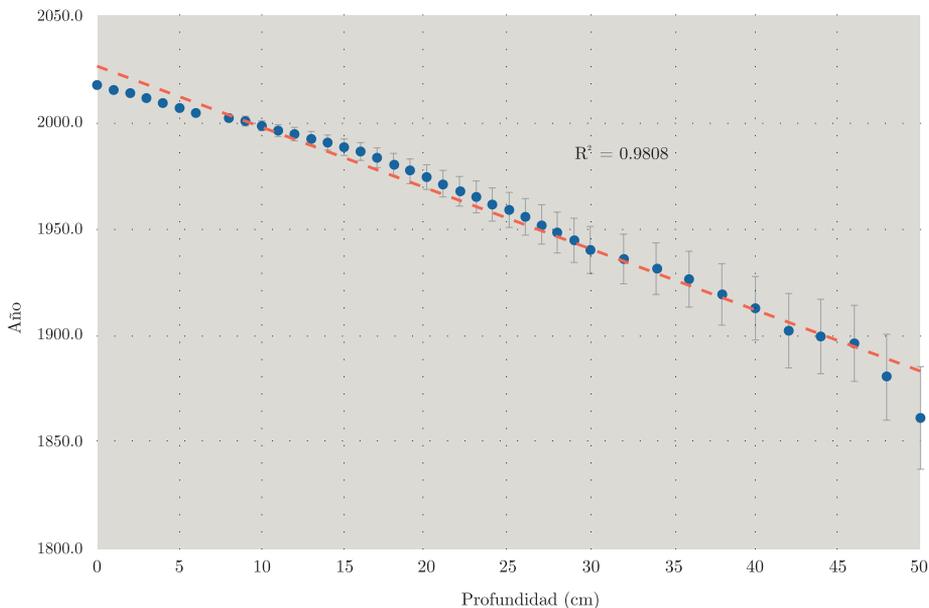


Figura 7. Datación por ^{210}Pb utilizando el modelo de flujo constante (CRS)

DISCUSIÓN

Al evaluar los modelos matemáticos CIC y CRS utilizados, se observa que el CIC tiene una dificultad al suponer una concentración inicial de depósito de $^{210}\text{Pb}_{\text{ex}}$ constante, lo que implica que la masa anual de sedimento tiene la misma proporción de $^{210}\text{Pb}_{\text{ex}}$. Esto no es real en zonas de alta presión antropomórfica, con variabilidad anual de precipitaciones o presencia de otros procesos erosivos, algunos de ellos característicos de la zona costera donde esta laguna se ubica (ej. Harris, et al., 2014). Por otro lado, el modelo CRS parte del supuesto de que la cantidad de $^{210}\text{Pb}_{\text{ex}}$ anual por área es la misma; solamente requiere que el aporte de $^{210}\text{Pb}_{\text{ex}}$ sea constante en el tiempo, lo que constituye una suposición mucho más general (Fernández García, 2012). Asimismo, del grado de ajuste presentado por los datos del testigo de la Laguna de las Nutrias a ambos modelos, representado en el valor de r^2 , es posible inferir que el modelo de mejor ajuste es el CRS.

En ambos modelos, para el cálculo de incertidumbres se realizó la propagación de la incertidumbre de las medidas de ^{210}Pb y ^{226}Ra implicadas en cada punto.

Verificación de modelo CRS mediante distribución temporal de actividad de ^{137}Cs

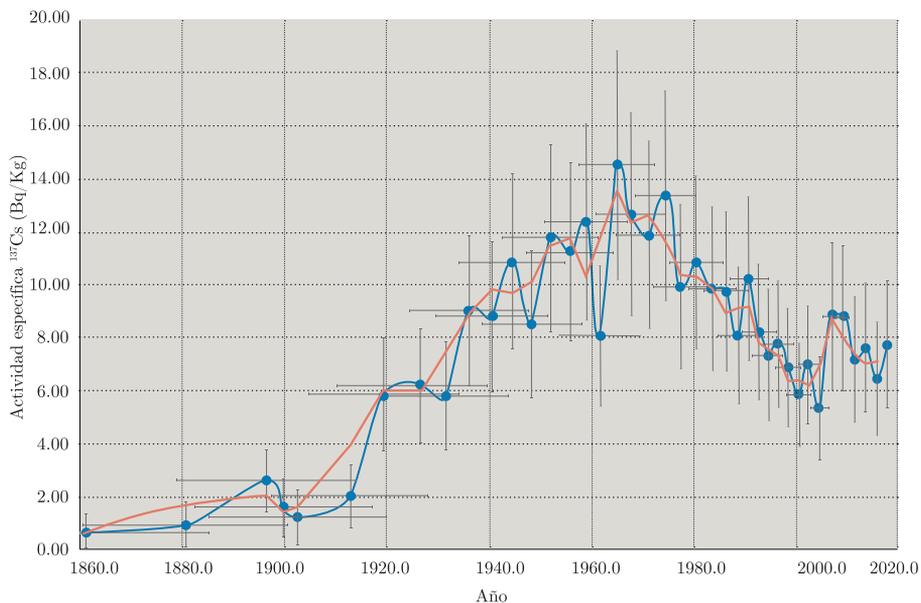


Figura 8. Distribución de actividad específica de ^{137}Cs en función del tiempo

En la Figura 8 se representa un gráfico de actividad específica de ^{137}Cs para cada sección del testigo, en relación a la datación realizada mediante el modelo CRS. En trazo azul de dicha figura se grafica la actividad específica de ^{137}Cs , de origen antrópico, generado por fisión nuclear y liberado al ambiente en accidentes nucleares o pruebas de armas nucleares. Además, en trazo rojo se muestra la línea de tendencia suavizada según la media móvil cada 2 puntos. En dicha figura se pueden encontrar diversos máximos, correspondientes a procesos de fisión como los anteriormente mencionados, que se dieron en diferentes lugares del planeta; los de mayor importancia son presentados en la Tabla 1.

Los corrimientos de las fechas con respecto a los eventos señalados pueden deberse a dinámicas de transporte atmosférico, ya que una vez que alcanzan la atmósfera, los radionucleidos demoran desde meses hasta años en transportarse, hasta finalmente depositarse en el sedimento. Los fenómenos de distribución se dan primero a nivel troposférico, extendiéndose dentro del mismo hemisferio, por vientos, y luego, a nivel estratosférico de manera global, por difusión y decantación. La presencia de valores de ^{137}Cs mayores a 0 desde 1900 y su crecimiento hacia los años donde encontramos los máximos se deben a movilidad vertical post-deposición de dicho radionucleido en el sedimento (Foster, et al., 2006). Las incertidumbres presentadas en dicho gráfico son, en el eje X las correspondientes a las dataciones realizadas según el modelo CRS, y en el eje Y calculadas de forma análoga a las de los demás radionucleidos medidos.

Tabla 1. Máximos de distribución de ^{137}Cs y los eventos históricos asociados

Máximo de ^{137}Cs	Evento asociado	Tiempo (años AD)
1950.4 ± 9.5 1957.7 ± 8.4	Bombas nucleares de Hiroshima, Nagasaki (Japón) y Trinidad (Estados Unidos)	1945
1964.1 ± 7.6	Pruebas de armamento nuclear efectuadas principalmente en Muroroa, Pacífico Sur, por el gobierno francés	1963
1990.5 ± 3.7	Accidente de Chernóbil, Ucrania	1986
2009.2 ± 1.2	Accidente de Fukushima, Japón	2011

En base al modelo de datación mediante CRS se pudo calcular la tasa de sedimentación. En la Figura 9 se presenta un gráfico de dicha tasa de sedimentación en función del tiempo. En el mismo se observan dos zonas con tasas de sedimentación diferentes, pero a la vez aproximadamente constantes para cada período. Específicamente, en una zona inferior (Zona A), estimada desde 1870 (límite inferior de confiabilidad para dataciones actuales por ^{210}Pb) hasta 1986, de $3.1 \pm 1.5 \text{ mm/año}^{-1}$, y una zona superior (Zona B), desde 1986 hasta el 2018, de $4.7 \pm 0.8 \text{ mm/año}^{-1}$. Dichas tasas de sedimentación son calculadas como la media de las tasas de sedimentación en cada zona, representadas en el gráfico de la Figura 9 como líneas de trazo rojo, punteado. Asimismo, los intervalos de confianza son calculados como el doble de la desviación estándar de las tasas de sedimentación, y son representados en el gráfico como zonas grises. El incremento de sedimentación reflejado entre las zonas A y B del gráfico se explica por la tendencia histórica creciente de precipitación total anual, según indican los datos climáticos históricos de la estación pluviométrica Rocha, donde se observan precipitaciones menores a 900 mm/año^{-1} hasta la década de 1980, y mayores a 1100 mm/año^{-1} a partir de la misma (García-Rodríguez, 2002).

Cabe destacar que con anterioridad a 1880 se observa un evento de muy baja sedimentación (seno) asociado a otro posterior, entre 1880 y 1900, de muy alta tasa de sedimentación (cresta). Esto podría corresponderse con la alternancia de período de sequía extrema, pero con suelos aún vegetados, y escasos aportes de sedimentos al cuerpo lagunar, seguido de un período húmedo. Durante este último, las abundantes lluvias habrían generado procesos de erosión y escorrentía superficial (lavado) sobre un suelo con un escaso tapiz vegetal, favoreciendo el aporte de sedimento, con el consiguiente aumento de la tasa de sedimentación. Este escenario podría asignarse a las condiciones que imperaron en el hemisferio

sur durante la Pequeña Edad del Hielo (Piovano, et al., 2002; del Puerto et al., 2011). Si bien para inferir las edades anteriores a 1870 se podría suponer que la tasa de sedimentación se mantuvo relativamente constante en 3.1 mm/año^{-1} , esto podría derivar en un error en caso de existir eventos extremos que afecten directamente la tasa de sedimentación, como el inferido anteriormente.

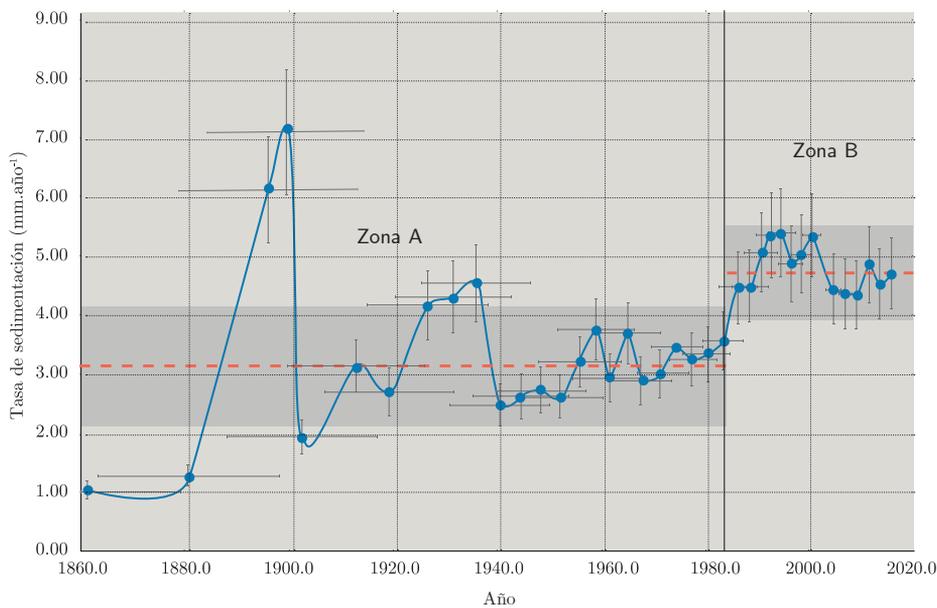


Figura 9. Distribución de tasa de sedimentación respecto al tiempo

CONCLUSIONES

Se ha presentado el desarrollo de una metodología adecuada para realizar geocronología mediante ^{210}Pb - ^{137}Cs en sistemas lacustres. Estas capacidades analíticas y de trabajo se encuentran actualmente disponibles en Uruguay. La metodología fue aplicada a la Laguna de las Nutrias como un caso de estudio, obteniéndose edades certeras mediante el uso del modelo de flujo constante de ^{210}Pb ; verificadas por la aparición en el perfil sedimentario de concentraciones máximas de ^{137}Cs provenientes de eventos históricos conocidos. Asimismo, dicha metodología ha sido empleada para obtener la tasa de sedimentación interanual de la laguna, marcando dos períodos con diferentes tasas de sedimentación, bien delimitados y asociados a la pluviosidad total anual, y un evento climático extremo de aridez (posiblemente asociado a la pequeña edad del hielo). Las capacidades metodológicas desarrolladas podrán ser utilizadas por diversos investigadores en reconstrucciones paleoambientales, permitiendo evaluar procesos históricos tanto naturales como antrópicos asociados a cuerpos de agua con características ambientales similares a la Laguna de las Nutrias.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos muy especialmente a Felipe García-Rodríguez, del Polo de Desarrollo Universitario “Geociencias del Holoceno”, Centro Universitario Regional del Este, Universidad de la República, Uruguay, por la colaboración en el trabajo de campo y corrección del texto. A Laura Pérez, Fabrizio Scarabino, Leticia González y Leandro Bergamino, del mismo Polo de Desarrollo Universitario, por su colaboración en el trabajo de campo. A Heinkel Bentos Pereira y Ana Lía Noguera del Grupo de Desarrollo de Materiales y Estudios Ambientales, Departamento de Desarrollo Tecnológico, Centro Universitario Regional del Este, Universidad de la República, Uruguay, por el apoyo técnico y por su colaboración en la utilización del sistema gamma respectivamente. Asimismo, agradecemos al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) y a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de la Universidad de la República por el financiamiento.

REFERENCIAS

- Appleby, P.G. y Oldfield, F., 1978. The calculation of lead-210 dates assuming a constant rate of supply of unsupported ^{210}Pb to the sediment. En: *CATENA*, 5(1), pp.1–8. doi: 10.1016/S0341-8162(78)80002-2.
- Azcune, G., Capdepon Caffa, I. y García-Rodríguez, F., 2019. Contextos geocronológicos de eventos naturales y culturales de Uruguay. En: *Revista De Geología (UFC)*, 32(1), pp.126–146.
- Baeza, J., Taddei, A., Femenías, J., Rodríguez, O., Melgar, W., Díaz, A. y Fornaro, M., 1977. Investigaciones arqueológicas en el área de Salto Grande: tres primeros radiocarbonos. En: *V Encuentro de Arqueología del Litoral*. Río Negro: Intendencia Municipal de Río Negro, Ministerio de Educación y Cultura. pp.67-88.
- Baeza, J., 1985. *Los fechados radiocarbónicos de Salto Grande, estado actual de las investigaciones arqueológicas en el Uruguay*. Montevideo: Centro de Estudios Arqueológicos.
- Bueno, C., Brugnoli, E., Bergamino, L., Muniz, P., García-Rodríguez, F. y Figueira, R., 2018. Anthropogenic and natural variability in the composition of sedimentary organic matter of the urbanised coastal zone of Montevideo (Río de la Plata). En: *Marine Pollution Bulletin*, 126, pp.197–203. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.11.009.
- Chang, Y., Berelson, W. M. y Li, H., 2017. AMS ^{14}C and ^{210}Pb dating on a 51-cm sediment core from Santa Barbara Basin, CA: old carbon source. En: *Geophysical Research Abstracts*, 19(3), p.11308.

- Crozaz, G., Picciotto, E. y De Breuck, W., 1964. Antarctic snow chronology with Pb 210. En: *Journal of Geophysical Research*, 69(12), pp.2597–2604. doi: 10.1029/JZ069i012p02597.
- Crusius, J. y Anderson, R.F., 1995. Sediment focusing in six small lakes inferred from radionuclide profiles. En: *Journal of Paleolimnology*, 13(2), pp.143–155. doi: 10.1007/BF00678103.
- Fernández García, A., 2012. *Datación de sedimentos y evaluación de tasas de sedimentación mediante el análisis de isótopos radiactivos de origen natural y artificial usados como trazadores*. Santander: Universidad de Cantabria. (Tesis de Maestría).
- Foster, I.D.L., Mighall, T.M., Proffitt, H., Walling, D.E. y Owens, P.N., 2006. Post-depositional ^{137}Cs mobility in the sediments of three shallow coastal lagoons, SW England. En: *Journal of Paleolimnology*, 35(4), pp.881–895. doi: 10.1007/s10933-005-6187-6.
- García-Rodríguez, Felipe, 2002. *Estudio paleolimnológico de lagunas de Rocha, Castillos y Blanca, sudeste del Uruguay*. Montevideo: Facultad de Ciencias, Universidad de la República. (Tesis de Doctorado).
- 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.
- Goldberg, E.D., 1963. Geochronology with ^{210}Pb . En: IAEA, ed. *Proceedings of the Symposium on Radioactive Dating*. Viena: International Association of Hydrological Sciences. pp.122–130.
- Harris, I., Jones, P.D., Osborn, T.J. y Lister, D.H., 2014. Updated high-resolution grids of monthly climatic observations - the CRU TS3.10 Dataset. En: *International Journal of Climatology*, 34(3), pp.623–642. doi: 10.1002/joc.3711.
- Hu, G., Chaolu, Y., Jiafu, Z., Guirong, C., Baolin, P., Jinhua, L., Tao, J., Shuangwen, Y., Dehong, L. y Jianwei H., 2018. Chronology of a lacustrine core from Lake Linggo Co using a combination of OSL, ^{14}C and ^{210}Pb dating: implications for the dating of lacustrine sediments from the Tibetan Plateau. En: *Boreas*, 47(2), pp.656–670. doi: 10.1111/bor.12291.
- Ivanovich, M. y Harmon, R.S., 1992. *Uranium-series disequilibrium: applications to earth, marine, and environmental sciences*. 2da ed. Oxford: Clarendon Press.

- Koide, M., Bruland, K.W. y Goldberg, E.D., 1973. Th-228/Th-232 and Pb-210 geochronologies in marine and lake sediments. En: *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 37(5), pp.1171–1187. doi: 10.1016/0016-7037(73)90054-9.
- Koide, M., Soutar, A. y Goldberg, E.D., 1972. Marine geochronology with ²¹⁰Pb. En: *Earth and Planetary Science Letters*, 14(3), pp.442–446. doi: 10.1016/0012-821X(72)90146-X.
- Krishnaswamy, S., Lal, D., Martin, J.M. y Meybeck, M., 1971. Geochronology of lake sediments. En: *Earth and Planetary Science Letters*, 11(1), pp.407–414. doi: 10.1016/0012-821X(71)90202-0.
- Kruk, C., Rodríguez-Gallego, L., Quintans, F., Lacerot, G., Scasso, F., Mazzeo, N., Meerhoff, M., y Paggi, J.C., 2006. Biodiversidad y calidad de agua de 18 pequeñas lagunas en la costa sureste de Uruguay. En: Menafrá, R., Rodríguez-Gallego, L., Scarabino, L. y Conde, D., eds. *Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya*. Montevideo: Vida Silvestre Uruguay. pp.599–610.
- Kruk, C., Rodríguez-Gallego, L., Meerhoff, M., Quintans, F., Lacerot, G., Mazzeo, N., Scasso, F., Paggi, J.C., Edwin, T.H., Peeters, M. Y Scheffer, M., 2009. Determinants of biodiversity in subtropical shallow lakes (Atlantic coast, Uruguay). En: *Freshwater Biology*, 54(12), pp.2628–2641. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2009.02274.x>
- Madella, M., Powers-Jones, A.H. y Jones, M.K., 1998. A simple method of extraction of opal phytoliths from sediments using a non-toxic heavy liquid. En: *Journal of Archaeological Science*, 25(8), pp.801–803. doi: 10.1006/jasc.1997.0226.
- Marrero, A., Tudurí, A., Perez, L., Cuña, C., Muniz, P., Lopes Figueira, R.C., de Mahiques, M.M., de Lima Ferreira, P.A., Pittauerová, D., Hanebuth, T.J.J. y García-Rodríguez, F. 2014. Historical changes in terrigenous river supply from the Río de la Plata basin to the inner shelf of Uruguay. En: *Latin American Journal of Sedimentology and Basin Analysis*, 21(2), pp.165–179.
- Piovano, E.L., Ariztegui, D. y Moreira, S.D., 2002. Recent environmental changes in Laguna Mar Chiquita (central Argentina): a sedimentary model for a highly variable saline lake. En: *Sedimentology*, 49(6), pp.1371–1384. doi: 10.1046/j.1365-3091.2002.00503.x.
- Puente, I., 2005. *La historia de la medición del tiempo y la noción de tiempo*. [s.l.]: [s.n.]. [Consulta: 28 de febrero de 2020] Disponible en: https://www.academia.edu/5198951/LA_HISTORIA_DE_LA_MEDICIÓN_DEL_TIEMPO_Y_LA_NOCIÓN_DE_TIEMPO.

- Del Puerto, L., García-Rodríguez, F., Bracco, R., Castiñeira, C., Blasi, A., Inda, H., Mazzeo, N. y Rodríguez, A., 2011. Evolución climática holocénica para el Sudeste del Uruguay: análisis multi-proxy en testigos de lagunas costeras. En: García-Rodríguez, F., ed. *El Holoceno en la zona costera del Uruguay*. Montevideo: UdelaR. p. 263. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Rink, W.J. y Thompson, J.W., eds., 2015. *Encyclopedia of scientific dating methods*. Amsterdam: Springer. (Encyclopedia of Earth Sciences Series)
- Robbins, J.A. y Edgington, D.N., 1975. Determination of recent sedimentation rates in Lake Michigan using Pb-210 and Cs-137. En: *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 39(3), pp.285–304. doi: 10.1016/0016-7037(75)90198-2.
- Sánchez-Cabeza, J., Díaz-Asencio, M. y Ruiz-Fernández, A.C., 2012. *Radiocronología de sedimentos costeros utilizando ^{210}Pb : modelos, validación y aplicaciones*. Viena: OIEA. ISBN: 978-92-0-325210-2
- Shamsuzzoha Basunia, M., 2014. Nuclear data sheets for A = 210. En: *Nuclear Data Sheets*, 121, pp.561–694. <https://doi.org/10.1016/j.nds.2014.09.004>
- Tylmann, W., Bonka, A., Goslarbc, T., Wulfde, S. y Grosjeanf, M., 2016. Calibrating ^{210}Pb dating results with varve chronology and independent chronostratigraphic markers: problems and implications. En: *Quaternary Geochronology*, (32), pp.1–10. <https://doi.org/10.1016/j.quageo.2015.11.004>

Efecto de la variedad y de la humedad de cosecha en la temperatura de transición vítrea de variedades uruguayas de arroz

Effect of rice variety and harvest moisture content on the glass transition temperature of Uruguayan rice varieties

Efeito da variedade e da humidade de colheita na temperatura de transição vítrea de variedades uruguaias de arroz

RECIBIDO: 10/9/2019 → APROBADO: 2/4/2020 ✉ lagarcia@latitud.org.uy

✉ GARCÍA LLOBODANIN, LAURA (1); PONCE DE LEÓN, NATALIA (1);
MOREIRA, SEBASTIÁN (1); BILLIRIS, ALEJANDRA (1);

(1) LATITUD – FUNDACIÓN LATU. MONTEVIDEO, URUGUAY

RESUMEN

La temperatura de transición vítrea (T_g) de un material es el rango de temperaturas donde ocurre la transición entre un estado cauchoso y un estado vítreo, produciéndose cambios que se ven reflejados en sus propiedades fisicoquímicas. El objetivo de este trabajo es determinar las curvas de transición vítrea (T_g vs. Humedad de grano) de tres variedades uruguayas de arroz y evaluar si existen diferencias significativas entre ellas. Se estudia también la influencia de la humedad de cosecha (HC). Para ello, cada muestra de arroz se seca por diferentes períodos de tiempo para obtener humedades de grano (HG) en un rango entre 10% y 22% (en base húmeda).

A continuación, se mide la T_g por calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los resultados se comparan aplicando ANOVA y el test de Tukey. Se observó que la T_g aumenta a medida que disminuye la HG para las tres variedades estudiadas. Las curvas de transición vítrea muestran que existen diferencias significativas entre las tres variedades en el rango de HG de 12% a 16%. La HC no afectó la T_g en todo el rango estudiado. Los resultados obtenidos pueden aplicarse para optimizar el proceso de secado del arroz, minimizando la formación de fisuras.

PALABRAS CLAVE: secado de arroz, calorimetría diferencial de barrido, DSC.

ABSTRACT

The glass transition temperature (T_g) of a material is the range of temperatures where the transition between a glassy and a rubbery state occurs, producing changes that are reflected in its physicochemical properties. The objective of this research is to determine the glass transition curves (T_g vs. grain moisture content) of three Uruguayan rice varieties and assess whether there are significant differences among them. The influence of the harvest moisture content (HMC) is also evaluated. To do this, each rice sample is dried for different periods of time to obtain grain moisture contents (GMC) in a range between 10% and 22% (on a wet basis).

The T_g is then measured by differential scanning calorimetry (DSC). The results are compared by applying ANOVA and the Tukey test. It was observed that the T_g increases as GMC decreases for the three varieties studied. The glass transition curves show that there are significant differences among the three varieties in the range of GMC going from 12% to 16%. The HMC did not affect the T_g in the range studied. The results obtained can be applied to optimize the rice drying process, minimizing the formation of fissures.

KEYWORDS: rice drying, differential scanning calorimetry, DSC.

RESUMO

A temperatura de transição vítrea (T_g) de um material é o intervalo de temperaturas em que ocorre a transição entre um estado borrachoso e um estado vítreo, produzindo-se alterações que se refletem em suas propriedades físico-químicas. O objetivo deste trabalho é determinar as curvas de transição vítrea (T_g x Umidade de grão) de três variedades de arroz uruguaias e avaliar se há diferenças significativas entre elas. A influência da umidade de colheita (UC) também é estudada. Para isso, cada amostra de arroz é secada por diferentes períodos de tempo para obter umidades de grão (UG) em um intervalo entre 10% e 22% (em base úmida).

A seguir, a T_g é medida por calorimetria de varredura diferencial (DSC). Os resultados são comparados aplicando ANOVA e o teste de Tukey. Observou-se que a T_g aumenta à medida que a UG diminui nas três variedades estudadas. As curvas de transição vítrea mostram que há diferenças significativas entre as três variedades no intervalo de UG de 12% a 16%. A UC não afetou a T_g em todo o intervalo estudado. Os resultados obtidos podem ser aplicados para otimizar o processo de secagem do arroz, minimizando a formação de fissuras.

PALAVRAS CHAVE: secagem de arroz, calorimetria de varredura diferencial, DSC.

INTRODUCCIÓN

El arroz es uno de los cereales más consumidos alrededor del mundo. Está compuesto principalmente por agua y diferentes biopolímeros (Sun, et al., 2002). El almidón, principal biopolímero del arroz, tiene una estructura semi-cristalina formada por moléculas de amilosa casi lineales y moléculas de amilopectina altamente ramificadas (Zeleznek y Hosene, 1987). La amilosa y los puntos de ramificación de la amilopectina

constituyen la fase amorfa, mientras que las cadenas de ramificación de la amilopectina constituyen la fase cristalina del gránulo de almidón (Perdon, et al., 2000).

La composición del almidón tiene una fuerte influencia en las propiedades del arroz. El fenómeno de transición vítrea ocurre en la parte amorfa, siendo la temperatura de transición vítrea (T_g) el rango de temperaturas donde se transita del estado vítreo al estado cauchoso (Liu, et al., 2010). Durante la transición, el material sufre una serie de cambios drásticos que se reflejan en diversas propiedades de este. La dureza, el módulo de elasticidad y las fuerzas de tracción y compresión tienen un valor mayor en la zona vítrea respecto a la cauchosa, mientras que el calor específico, el volumen específico y el coeficiente de expansión son menores (Kunze, et al., 2004). Estos cambios en las propiedades del material se utilizan para determinar la T_g empleando diferentes técnicas. Las más utilizadas son la calorimetría diferencial de barrido (DSC), basada en el cambio de la capacidad calorífica, y el análisis mecánico dinámico (DMA), basado en un cambio en las propiedades de elasticidad y viscosidad del material (Liu, et al., 2010; Perdon, et al., 2000).

La T_g depende de diversos factores, tales como la humedad de grano (HG), la composición del almidón y las dimensiones del grano de arroz. Perdon et al. (2000) determinaron la T_g del arroz Bengal (cultivar de grano medio con bajo contenido de amilosa) y del arroz Cypress (cultivar de grano largo con alto contenido de amilosa) a diferentes humedades de grano, con el fin de desarrollar un diagrama de estado de arroz cargo. Ellos no encontraron un efecto significativo del cultivar en la T_g . Siebenmorgen y otros. (2004) tampoco encontraron un efecto significativo de la variedad de arroz en la T_g cuando compararon arroz Bengal (grano medio) con arroz Drew (grano largo).

Conocer la T_g de una variedad es de fundamental importancia durante el proceso de secado de la misma. Secar a una temperatura por debajo de T_g (estado vítreo) implica un proceso de secado más lento ya que los gránulos de almidón están más compactos y el agua se encuentra relativamente inmóvil (Siebenmorgen, et al., 2004). Por el contrario, secar a temperaturas superiores a la T_g (estado cauchoso) es más rápido ya que las moléculas tienen una movilidad mayor, por lo que la humedad puede difundir hacia el exterior del grano más fácilmente. Sin embargo, el secado a altas temperaturas genera un gradiente severo de humedad dentro del grano de arroz, ya que el agua es removida de la superficie más rápido de lo que demora en migrar desde el centro del grano hacia la misma. Un gradiente de temperatura o de humedad puede generar dentro del grano regiones con diferentes propiedades mecánicas, ya que parte de este puede encontrarse en estado vítreo y parte en estado cauchoso (Perdon, et al., 2000). Estas diferencias crean tensiones de tracción y compresión que pueden resultar suficientes para fisurar el grano. El *tempering*, un proceso que mantiene los granos de arroz en recipientes a la temperatura de secado durante determinado lapso de tiempo, se utiliza para atenuar este efecto. El objetivo es disminuir el gradiente de humedad permitiendo que el agua migre desde el centro a la superficie del grano sin que exista evaporación en la superficie, y, por lo tanto, obtener una humedad uniforme dentro del mismo (Cnossen, et al., 2001). Cnossen y Siebenmorgen (2000) encontraron que altas temperaturas de secado pueden utilizarse sin reducir el ren-

dimiento siempre y cuando se aplique un período de *tempering* suficiente a temperaturas superiores a la T_g . De esta forma, conocer la T_g del arroz antes de iniciar el proceso de secado permite establecer las mejores condiciones de secado y *tempering*, optimizando el proceso y reduciendo la formación de fisuras.

Uruguay ha desarrollado sus propias variedades de arroz apuntando a un nicho de mercado de alta calidad. Dentro de este contexto, resulta de interés determinar la T_g de estas variedades de forma de optimizar el proceso de secado, aumentando así el rendimiento y la productividad económica.

El objetivo del presente trabajo es determinar las curvas de transición vítrea (T_g vs. HG) de tres variedades uruguayas de arroz y evaluar la influencia de la variedad y la humedad de cosecha en las mismas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de arroz

Tres variedades de arroz uruguayas, Uy1, Uy2 y Uy3, son cosechadas en 2017 en la región sudeste del país. Las mismas habían sido caracterizadas anteriormente (determinación de longitud, ancho y espesor de grano promedios) pasando dos muestras de 150g de cada variedad por un clasificador de arroz por imagen (Selgros, Brasil).

Para las variedades Uy1 y Uy3, se recolectan muestras con dos humedades de cosecha (HC) diferentes para evaluar el efecto de este parámetro en la T_g . Todas las muestras son transportadas al laboratorio, donde se determinan sus humedades. A continuación, cada muestra se divide en tres submuestras (triplicado). Se coloca 1 kg de cada triplicado en una cámara de secado y se extraen muestras de 50 g de cada una a diferentes tiempos (correspondientes a diferentes HG). Se determina la HG y la T_g de cada una, según se detalla a continuación.

Secado y determinación de humedad

El arroz se seca en condiciones suaves usando una cámara con temperatura y humedad relativa del aire controladas (Alfa Laval Gruppe, Alemania), hasta alcanzar la HG deseada (entre 10% y 22% en base húmeda). Las condiciones del aire se regulan a 22°C y 65% de humedad relativa (HR) o 32°C y 50% de HR, dependiendo de las HG que se quieran alcanzar.

Para medir la HG, se muele la muestra en un molino manual (Kett, Japón), se pesan aproximadamente tres gramos en una cápsula de aluminio y se secan en una estufa de convección forzada (Mettler, Alemania) a 130°C durante una hora. El contenido de humedad de la muestra se calcula por gravimetría y se expresa como porcentaje en base húmeda.

Para muestras con HG mayor a 16%, se utiliza un método en dos etapas (Jindal y Siebenmorgen, 1987). Se pesan aproximadamente 20 g de arroz paddy, se dejan secar sobre la superficie de la estufa durante 24 horas y se pesan nuevamente (para determinar la pérdida de agua). Luego, se muelen aproximadamente tres gramos

de dicha muestra y se procede de la misma forma que para las muestras de HG menor a 16%.

Determinación de T_g

La T_g se mide utilizando calorimetría diferencial de barrido (DSC) siguiendo el procedimiento descrito por Perdon y otros. (2000). Este método se basa en la determinación de la variación de la capacidad calorífica cuando se produce la transición del estado vítreo al cauchoso. El equipo utilizado es un DSC Q2000 (TA Instruments, Estados Unidos) calibrado con indio. El rango de temperatura va de -50°C a 150°C , con una velocidad de calentamiento de $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Los granos se pelan manualmente y se cortan en tres partes iguales con bisturí. Posteriormente, se colocan en cápsulas de aluminio con tapa hermética (TA Instruments, Suiza) y se sellan. Como referencia se utiliza una cápsula vacía tapada y sellada. Se toma como T_g , la temperatura en el punto de inflexión de la curva de capacidad calorífica (calor en función de la temperatura). Se analizan un total de cinco granos de cada triplicado (quince granos para cada condición de variedad y HG), cuidando que no estén dañados ni tengan ningún defecto.

Análisis estadístico

Se comparan las T_g de las diferentes variedades a cada HG aplicando análisis de varianza (ANOVA de un factor). Dado que las humedades de grano de las muestras no son exactamente iguales, para obtener valores de T_g a una humedad de grano determinada y poder comparar, se realiza una interpolación lineal entre las dos HG más próximas. En caso de existir diferencia significativa entre las muestras, se aplica el test de Tukey para conocer cuáles son las muestras diferentes entre sí.

Para determinar si existe influencia de la HC en la T_g , se aplica ANOVA de un factor a las muestras de una misma variedad y diferentes HC, para las diferentes HG estudiadas. Nuevamente, para obtener valores de T_g a una humedad de grano determinada, se realiza una interpolación lineal entre las dos HG más próximas. Para todos los análisis se utiliza el programa JMP versión 12 (SAS Institute, Estados Unidos).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la caracterización dimensional de Uy1, Uy2 y Uy3. A pesar de que las tres variedades son consideradas de grano largo, se observa una diferencia en la longitud del grano, siendo la variedad Uy1 la más larga y la Uy3 la más corta.

Tabla 1. Dimensiones promedio de arroz cargo de las variedades Uy1, Uy2 y Uy3.
L/A: relación (Largo/Ancho) promedio de cada variedad.

Variedad	Largo (mm)	Ancho (mm)	L/A	Espesor (mm)
Uy1	7,6	2,1	3,6	1,9
Uy2	7,4	2,2	3,4	1,9
Uy3	6,7	2,0	3,4	1,7

La Tabla 2 muestra las HC, la humedad inicial de cada triplicado (HI) y las HG de los triplicados a medida que se fueron secando en cámara. Todas las humedades se expresan en base húmeda.

Tabla 2. Humedades de cosecha (HC) promedio del lote, humedad inicial de cada triplicado (HI) y humedades de grano (HG) a diferentes tiempos de secado en cámara (subíndices de HG de 1 a 10 indican tiempos de secado diferentes).

Secado en cámara													
Variedad	HC (%)	HI (%)	HG ₁ (%)	HG ₂ (%)	HG ₃ (%)	HG ₄ (%)	HG ₅ (%)	HG ₆ (%)	HG ₇ (%)	HG ₈ (%)	HG ₉ (%)	HG ₁₀ (%)	
Uy1		21,8		20,0		18,0	17,1	15,4	13,7	12,8	12,0	10,3	
		21,7	21,6	21,0	20,5	19,9	18,5	17,5	14,6	12,8	11,8	11,2	10,5
		21,6	20,7	20,2	19,5	18,2	17,5	14,8	13,0	12,2	11,6	10,4	
		18,0	16,7	16,0	14,2	13,5	12,3	10,4					
		18,0	18,0	16,7	15,9	13,9	12,9	12,0	10,4				
		18,0	16,7	15,7	14,7	13,6	12,8	10,1					
Uy2		22,1	21,2	20,0	18,6	17,3	14,3	12,7	11,4	10,3			
		21,9	21,8	20,5	19,5	18,6	17,1	14,0	12,3	11,6	10,3		
		21,8	21,3	20,8	18,7	17,0	13,8	12,1	11,2	10,3			
Uy3		21,1	20,4	20,0	18,9	17,7	15,0	12,8	11,9	11,2	10,2		
		21,2	21,2	20,4	19,5	18,2	17,6	13,9	12,7	11,9	10,9	10,2	
		21,3	20,2	19,1		17,3	15,2	12,3	11,6	10,8	10,1		
		18,6	17,1	15,9		13,6	13,1	11,6	11,1	10,16			
		18,6	18,6	16,9	15,9	14,6	13,3	12,4	12,0	11,3	11,01		
		18,6	16,9	16,2	14,1	13,5	12,7	12,0	11,5	10,92			

Para todas las variedades, los lotes cosechados con mayor humedad presentaron una HC de $21,6 \pm 0,5\%$. Los lotes de las variedades Uy1 y Uy3 cosechados más secos, presentaron una HC en el rango de $18,3 \pm 0,3\%$.

La Figura 1 muestra las curvas de T_g de las tres variedades estudiadas, construidas a partir de las muestras con una HC de $21,6 \pm 0,5\%$. Para la variedad Uy1, la T_g varió entre $45,2 \text{ }^\circ\text{C}$ y $49,1 \text{ }^\circ\text{C}$ en el rango de HG estudiado (10 - 22%). En el mismo rango, la variación para la variedad Uy2 fue entre $46,3 \text{ }^\circ\text{C}$ y $49,1 \text{ }^\circ\text{C}$ y para la variedad Uy3 entre $46,7 \text{ }^\circ\text{C}$ y $51,4 \text{ }^\circ\text{C}$. Se observa que la T_g aumenta a medida que disminuye la HG para las tres variedades. Estos resultados son esperados ya que el agua posee un efecto plastificante en las partes amorfas del almidón (Sablani, et al., 2009). Resultados similares se encontraron en publicaciones anteriores donde se estudiaron muestras de almidón (Zeleznaek, et al., 1987; Liu, et al., 2010) y muestras de arroz de otras variedades (Sun, et al., 2002; Siebenmorgen, et al., 2004).

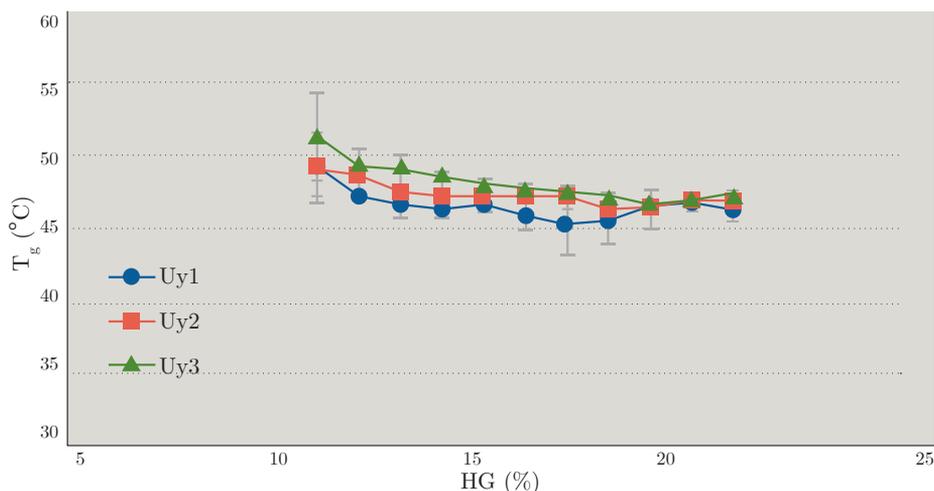


Figura 1. Curvas de temperatura de transición vítrea (T_g) en función de la humedad de grano (HG) de las variedades Uy1, Uy2 y Uy3 cosechadas a una humedad de $21,6 \pm 0,5\%$.

Aplicando ANOVA, se observa que existen diferencias significativas entre las T_g de las tres variedades cosechadas a una HC de $21,6 \pm 0,5\%$, en el rango de HG de 12% a 16%. En la Tabla 3 se muestran estos resultados (se muestra solo el rango de HG en el que hubo diferencias significativas) y los resultados del test de Tukey. Se observa que en el rango de HG de 12% a 16%, la T_g de la variedad Uy1 siempre fue significativamente menor que la T_g de la variedad Uy3 (para una misma HG), mientras que para la variedad Uy2 en general no hubo diferencias significativas con ninguna de las otras dos variedades (excepto para las HG de 12% y 14%).

Teniendo en cuenta las dimensiones de los granos de cada variedad (Tabla 1), podemos concluir que las variedades con mayor diferencia entre sus T_g (Uy1 y Uy3) son las que presentan mayor diferencia en el largo de grano.

Tabla 3. Comparación de las temperaturas de transición vítrea (T_g) de las variedades Uy1, Uy2 y Uy3 a diferentes humedades de grano (HG), para una humedad de cosecha de $21,6 \pm 0,5\%$.
 $T_{g,1}$, $T_{g,2}$ y $T_{g,3}$ son triplicados de una misma condición.
 1: $p < 0,05$ indica diferencia significativa; 2: letras iguales indican que no existe diferencia significativa.

HG (%)	Variedad	$T_{g,1}$ (°C)	$T_{g,2}$ (°C)	$T_{g,3}$ (°C)	ANOVA ¹	Tukey Test ²
16	Uy1	44,62	46,56	46,50		A
	Uy2	46,67	47,13	47,83	$p=0,04243$	A,B
	Uy3	47,68	48,17	47,76		B
15	Uy1	46,01	46,53	46,75		A
	Uy2	46,77	47,35	47,53	$p=0,00466$	A,B
	Uy3	47,95	48,46	47,84		B
14	Uy1	45,61	46,67	46,36		A
	Uy2	46,89	47,57	47,24	$p=0,00213$	A
	Uy3	48,89	48,74	48,05		B
13	Uy1	46,47	47,53	45,86		A
	Uy2	47,03	48,19	47,46	$p=0,01697$	A,B
	Uy3	49,83	49,40	48,26		B
12	Uy1	46,98	47,20	47,47		A
	Uy2	48,94	48,92	48,34	$p=0,00936$	B
	Uy3	48,69	50,56	49,28		B

Otros autores no encontraron diferencias significativas en las T_g cuando compararon una variedad de arroz de grano largo (Cypress) con una variedad de grano medio (Bengal) (Siebenmorgen, et al., 2004; Perdon, et al., 2000). Sun y otros. (2002) tampoco encontraron diferencias al comparar arroz de la variedad Drew (grano largo) con arroz de la variedad Bengal (grano medio) y Cypress (grano largo). Estas discrepancias con nuestros resultados se podrían deber a diferencias en la composición del almidón de cada variedad. Hay una relación directa entre la T_g y el peso molecular del almidón (Perdon, et al., 2000). Por otra parte, Liu y otros. (2010) encontraron que, a mayor contenido de amilosa en el almidón, mayor es la T_g . Considerando que las variedades Uy1 y Uy3 son las que tuvieron mayores diferencias en sus T_g , se eligieron estas para evaluar si existe un efecto de la HC en la T_g . La Figura 2 muestra las curvas de T_g de las variedades Uy1 y Uy3 construidas a partir de muestras con HC de $21,6 \pm 0,5\%$ y $18,3 \pm 0,3\%$.

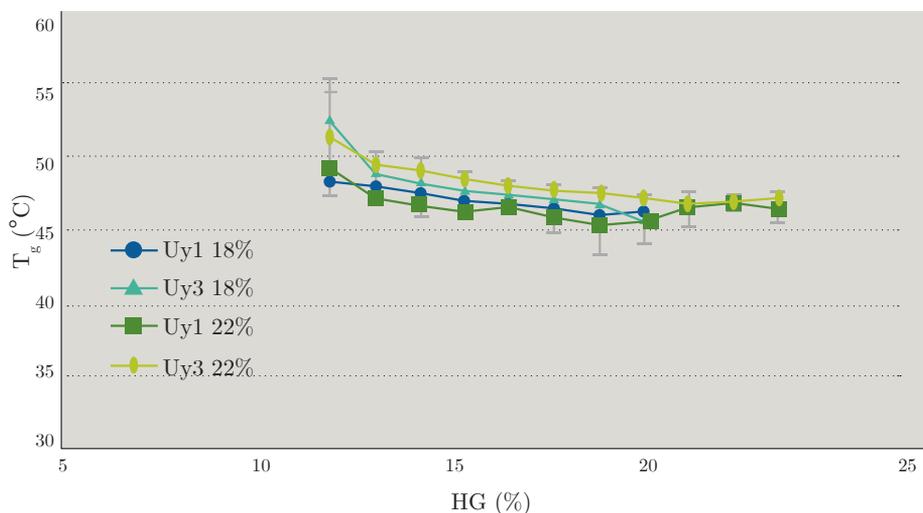


Figura 2. Curvas de transición vítrea (T_g) de las variedades Uy1 y Uy3 cosechadas a humedades de $21,6 \pm 0,5\%$ y $18,3 \pm 0,5\%$.

Aplicando ANOVA para comparar las T_g de la variedad Uy1 con una HC de 21,6% respecto a las T_g de la misma variedad a una HC de 18,3%, se observa que no existen diferencias significativas para ninguna de las HG analizadas (rango 11 – 18%). Para la variedad Uy3 tampoco se observa una diferencia significativa de la T_g entre las dos HC analizadas, para todo el rango de HG (datos no mostrados). Por lo tanto, se concluye que la HC no afecta la T_g para las variedades y el rango de HG estudiados.

Conocer la T_g de las diferentes variedades uruguayas de arroz tiene una aplicación importante en la industria arrocera. Para que el almacenamiento del arroz sea seguro, el mismo se seca hasta una HG de 13% o inferior. Durante un típico proceso de secado, la temperatura del aire puede alcanzar los 60°C, por lo que los granos pueden encontrarse dentro o por encima del rango de T_g . Por otra parte, la humedad de las capas más superficiales del grano puede ser más baja que la humedad del centro, haciendo que la T_g de la superficie sea más alta (Cnossen y Siebenmorgen, 2000). Por lo tanto, los granos pueden encontrarse en estado vítreo, cauchoso o tener zonas en estado vítreo y zonas en estado cauchoso dentro de un mismo grano (Perdon, et al., 2000). Esto puede generar tensiones ocasionadas por el cambio en propiedades físicas al pasar de un estado a otro, llevando a la fisura del grano y por lo tanto a la disminución del rendimiento del proceso (Cnossen y Siebenmorgen, 2000). En base a esto, se podría pensar que resulta más conveniente secar a temperaturas por debajo de T_g . Sin embargo, la difusividad es mucho mayor en el estado cauchoso, por lo que el secado a temperaturas superiores a la T_g resulta más rápido y eficiente (Cnossen, et al., 2002). En la práctica, ciclos de secado y *tempering* alternados son utilizados para secar a una temperatura superior a la T_g , evitando la formación de fisuras y aumentando así el rendimiento del proceso (Schluterman y Siebenmorgen, 2007).

Por lo tanto, conocer las curvas de T_g de variedades uruguayas de arroz permite ajustar el proceso de secado para cada variedad, optimizando al mismo tiempo la velocidad de secado y el rendimiento del arroz obtenido.

CONCLUSIONES

Se construyeron las curvas de transición vítrea de tres variedades uruguayas de arroz. Las mismas mostraron diferencias significativas entre las variedades en un rango de HG de 12% a 16%. La HC no afectó la T_g en todo el rango estudiado.

Los resultados obtenidos pueden aplicarse para diseñar un proceso de secado que optimice la velocidad del mismo, al tiempo que minimice la formación de fisuras, aumentando así el rendimiento del arroz obtenido.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) por la financiación.

REFERENCIAS

- Cnossen, A.G. y Siebenmorgen, T.J., 2000. The glass transition temperature concept in rice drying and tempering: effect of milling quality. En: *Transactions of the ASABE*, 43(6), pp.1661-1667.
- Cnossen, A.G., Siebenmorgen, T.J. y Yang, W., 2002. The glass transition temperature concept in rice drying and tempering: effect on drying rate. En: *Transactions of the ASABE*, 45(3), pp.759-766.
- Cnossen, A.G., Siebenmorgen, T.J., Yang, W. y Bautista, R.C., 2001. An application of glass transition temperature to explain rice kernel fissure occurrence during the drying process. En: *Drying Technology*, 19(8), pp.1661-1682.
- Jindal, V.K. y Siebenmorgen, T.J., 1987. Effects of oven drying temperature and drying time on rough rice moisture content determination. En: *Transactions of the ASABE*, 30(4), pp.1185-1192.
- Kunze, O.R., Lan, Y. y Wratten, F.T., 2004. Physical and mechanical properties of rice. En: Champagne, E.T., ed. *Rice chemistry and technology*. Minnesota: AACC. pp.191-221.
- Liu, P., Yu, L., Wang, X., Li, D., Chen, L. y Li, X., 2010. Glass transition temperature of starches with different amylose/amylopectin ratios. En: *Journal of Cereal Science*, 51, pp.388-391.
- Perdon, A., Siebenmorgen, T.J. y Mauromoustakos, A., 2000. Glassy state transition and rice drying: Development of a brown rice state diagram. En: *Cereal Chemistry*, 77(6), pp.708-713.
- Sablani, S.S., Bruno, L., Kasapis, S. y Symaladevi, R.M., 2009. Thermal transitions of rice: development of a state diagram. En: *Journal of Food Engineering*, 90, pp.110-118.
- Schluterman, D.A. y Siebenmorgen, T.J., 2007. Relating rough rice moisture content reduction and tempering duration to head rice yield reduction. En: *Transactions of the ASABE*, 50(1), pp.137-142.

Siebenmorgen, T.J., Yang, W. y Sun, Z., 2004. Glass transition temperature of rice kernels determined by dynamic mechanical thermal analysis. En: *Transactions of the ASABE*, 47(3), pp.835-839.

Sun, Z., Yang, W., Siebenmorgen, T., Stelwagen, A. y Cnossen, A., 2002. Thermomechanical transitions of rice kernels. En: *Cereal Chemistry*, 79(3), pp.349-353.

Zeleznaek, K.J. y Hoseney, R.C., 1987. The glass transition in starch. En: *Cereal Chemistry*, 64(2), pp.121-124.

Aplicación del Código de Barras de ADN (*DNA Barcoding*) para la identificación de especies vegetales de interés industrial

Application of DNA Barcoding for the identification of plant species of industrial relevance

Aplicação do Código de Barras DNA para a identificação de espécies vegetais de interesse industrial

RECIBIDO: 21/4/2020 → APROBADO: 8/6/2020 ✉ frey@latitud.org.uy

✉ REY BENTOS, FABIANA (1); CAPDEVIELLE SOSA, FABIÁN (2)
(1) LATITUD, FUNDACIÓN LATU. MONTEVIDEO, URUGUAY
(2) UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DEL URUGUAY. DURAZNO, URUGUAY

RESUMEN

El mercado de productos botánicos se incrementa a nivel mundial debido a la preferencia de los consumidores por los productos naturales. Esto hace que sean blanco de adulteración, lo cual es más común y difícil de detectar en los derivados industrializados. Es crítico contar con procedimientos confiables que permitan su autenticación. En este estudio se aplicaron herramientas moleculares basadas en ADN para la generación de información genómica aplicada con el fin de clasificar muestras de hierbas aromáticas y medicinales. Se aplicó la estrategia del Código de Barras de ADN (*DNA Barcoding*) utilizando muestras de tejido fresco de identidad taxonómica conocida (referencias) y muestras industrializadas. Los resultados obtenidos indican que los marcadores *rbcL* y *matK* son amplificables con los cebadores utilizados, obteniéndose secuencias bidireccionales de alta calidad, en el caso de tejido fresco en el 83% de los casos para *rbcL* y en el 63% de los casos para *matK*. En las muestras industrializadas los valores fueron de 50% y 35% respectivamente. La herramienta BOLD permitió la clasificación de la mayor parte de las muestras. Esta metodología es una herramienta útil y accesible que permite la clasificación en grupos, si bien su desempeño se ve acotado por la representación de las especies en las bases de datos.

PALABRAS CLAVE: *barcodes rbcL y matK*, hierbas aromáticas y medicinales, clasificación.

ABSTRACT

The market for botanical products is growing worldwide due to consumers preference for natural products. This makes them targets for adulteration, which is more common and difficult to detect in industrialized derivatives. It is critical to have reliable procedures that allow their authentication. In this study, DNA-based molecular tools were applied to generate applied genomic information to classify samples of fresh and industrialized aromatic and medicinal herbs. The work was based on the DNA Barcoding strategy using fresh tissue samples of known taxonomic identity (references) and industrialized samples. The results obtained indicate that the *rbcL* and *matK* markers are amplifiable with the primers used, obtaining high quality bi-directional sequences in the case of fresh tissue in 83% of the cases for *rbcL* and in 63% of the cases for *matK*. In the industrialized samples the values were 50% and 35% respectively. The BOLD tool allowed the classification of most of the samples. This methodology is a useful and accessible tool that allows the classification in groups, although its performance is limited by the representation of the species in the databases.

KEYWORDS: *barcodes rbcL y matK*, aromatic and medicinal herbs, classification.

RESUMO

O mercado dos produtos botânicos está em crescimento a nível mundial, devido à preferência dos consumidores por produtos naturais. Isto torna-os alvos de adulteração, o que é mais comum e difícil de detectar nos derivados industrializados. É fundamental dispor de procedimentos fiáveis que permitam a sua autenticação. Neste estudo, foram aplicadas ferramentas moleculares baseadas no ADN para gerar informação genómica aplicada para classificar amostras de ervas aromáticas e medicinais frescas e industrializadas. O trabalho baseou-se na estratégia de codificação de barras de ADN utilizando amostras de tecido fresco de identidade taxonómica conhecida (referências) e amostras industrializadas. Os resultados obtidos indicam que os marcadores *rbcL* e *matK* são amplificáveis com os iniciadores utilizados, obtendo sequências bidireccionais de alta qualidade no caso do tecido fresco em 83% dos casos para *rbcL* e em 63% dos casos para *matK*. Nas amostras industrializadas, os valores foram de 50% e 35%, respectivamente. A ferramenta BOLD permitiu a classificação da maioria das amostras. Esta metodologia é uma ferramenta útil e acessível que permite a classificação em grupos, embora o seu desempenho seja limitado pela representação das espécies nas bases de dados.

PALAVRAS-CHAVE: *barcodes rbcL y matK*, ervas aromáticas e medicinais, classificação.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, los conceptos de calidad, autenticidad y trazabilidad han acaparado el interés de los consumidores, así como de la industria, los productores, los comerciantes y las agencias reguladoras. Los consumidores exigen alimentos frescos,

sabrosos, nutritivos y seguros. Más aún, un número cada vez más grande se inclina por el consumo de alimentos funcionales que ofrecen beneficios específicos para la salud (Opara, 2003).

En este escenario, las plantas aromáticas y medicinales han despertado gran interés por sus propiedades y por la necesidad de la población de establecer hábitos de vida más saludables. Son requeridas para uso culinario, medicinal, en perfumería y cosmética, aromaterapia, para la elaboración de suplementos alimenticios y extractos para la producción de nuevas drogas. Para ello se utilizan distintas partes de la planta (semillas, frutos, raíces, tallos, corteza, rizoma de las flores) con el fin de explotar sus propiedades terapéuticas, así como sus sabores o aromas (EFSA Scientific Committee, 2009), (World Health Organization, 1999). Como consecuencia, ha aumentado la demanda y el comercio de este tipo de plantas y sus derivados a nivel mundial. Un reporte publicado por Persistence Market Research da cuenta de este aumento, destacando que el valor del mercado global de suplementos botánicos en el año 2017 fue estimado en 40.000 millones de dólares y se proyecta en más de 65.000 millones de dólares para el año 2025 (Persistence Market Research, 2017).

A pesar de esto, la regulación de este tipo de productos, tanto para consumo alimentario como medicinal, aún sigue siendo muy variable entre los países (Schilter, et al., 2003). La ausencia de una regulación clara y compartida entre los diversos países, así como la creciente demanda de productos de alta calidad derivados de este tipo de plantas, ha conducido a un aumento en los casos de adulteración, sustitución y fraude (Frigerio, et al., 2019). Según un estudio publicado por Ichim, un 27% de los productos herbales que se ofrecen en el mercado global se encuentran adulterados ya sea porque contienen sustitutos no declarados, contaminantes, especies de relleno; o bien porque ninguna de las especies está declarada (Ichim, 2019).

Los criterios de identidad y pureza juegan un rol preponderante en el aseguramiento de la calidad y reproducibilidad de los productos derivados de estas materias primas, lo cual contribuye a su seguridad y eficacia (Joshi, 2004; Coutinho Moraes, et al., 2015). Los productos industrializados, deshidratados y en polvo son más propicios para las adulteraciones ya que el adulterante es más difícil de distinguir visualmente. Para estos fines es crítico contar con procedimientos confiables que permitan la autenticación. La Organización Mundial de la Salud (OMS) hace hincapié en la importancia de las metodologías cualitativas y cuantitativas que permitan estandarizar los materiales vegetales mediante su caracterización botánica, composición química y actividad biológica (Nikam, et al., 2012). Los métodos tradicionalmente utilizados para identificar especies en materiales botánicos se basan en la búsqueda de similitudes a nivel macroscópico y/o microscópico con respecto a un material estándar, así como en propiedades fisicoquímicas de los mismos. Estas metodologías presentan limitaciones para su uso en productos procesados en los que los caracteres morfológicos no se han preservado, pueden ser afectadas por las condiciones de cultivo y/o recolección, y requieren un alto nivel de experticia (Liu, et al., 2019; Lu, et al., 2019).

Los métodos moleculares basados en ADN permiten obtener información confiable ya que la composición genética es única para cada individuo y no se ve afectada por la edad, las condiciones fisiológicas, ni los factores ambientales. Como los marcadores no son específicos de un tejido pueden detectarse en cualquier estadio del desarrollo del

individuo (Heubl, 2010). El código de barras de ADN (*DNA Barcoding*) fue propuesto como una alternativa para identificar especies, basado en el uso de una pequeña región del genoma ubicada en una posición específica, que se encuentra presente en forma universal en todos los linajes y funciona como identificador único de cada especie (Hebert, et al., 2003). Inicialmente fue diseñado para su aplicación en animales, pero su uso fue extendido a plantas y hongos (Kress, 2017). En animales, el sistema se basa en la amplificación de la región 5' del gen de la subunidad 1 de la enzima citocromo oxidasa (*coxI*), ubicado en el genoma mitocondrial. Esta región, denominada CO1, cumple con los criterios establecidos para una región estándar (Kress y Erickson, 2007). En plantas, la elección de la región a utilizar fue compleja. La baja tasa de sustitución del ADN mitocondrial en plantas imposibilitó el uso de la región CO1, tal como sucede en animales. En 2009, luego de que se llevaran a cabo numerosos estudios, el *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL) recomendó la combinación de *rbcL* y *matK* como regiones estándar para plantas terrestres (CBOL Plant Working Group, 2009). Ambas corresponden a porciones de genes funcionales ubicadas en el cloroplasto (Fazekas, et al., 2008). A partir de allí varios autores han sugerido la combinación de estos dos marcadores con otros para mejorar la discriminación, como el marcador nuclear ITS, el espaciador intergénico *trnH-psbA* o el intrón *trnL* del cloroplasto (Chen, et al., 2010; Taberlet, et al., 2007; Newmaster, et al., 2007; Fazekas, et al., 2008).

En los últimos años se ha observado un aumento significativo en el número de publicaciones referidas al uso del Código de Barras de ADN (*DNA Barcoding*) para identificar especies vegetales de uso culinario o medicinal, y para autenticar o trazar plantas y productos botánicos. Este hecho es de suma importancia ya que demuestra el interés de la comunidad científica por un método con estas características (Bruni, et al., 2010; Stoeckle, et al., 2011; De Mattia, et al., 2011; Kool, et al., 2012; Newmaster, et al., 2013; Galimberti, et al., 2014; Vassou, et al., 2015; Frigerio, et al., 2019; Stallman, et al., 2019; Lu, et al., 2019; Veldman, et al., 2020). Asimismo, algunos estudios se han enfocado en la búsqueda de contaminaciones, sustituciones y uso de especies más económicas con la finalidad de adulterar productos botánicos (Stoeckle, et al., 2011; Newmaster, et al., 2013).

El objetivo de nuestro trabajo fue evaluar y demostrar la aplicabilidad de herramientas moleculares basadas en la estrategia del Código de Barras de ADN (*DNA Barcoding*), para la clasificación de muestras de especies vegetales -frescas y procesadas- de interés industrial en nuestro país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las especies incluidas en este trabajo se describen en la Tabla 1. Se utilizaron tres ejemplares de cada especie, excepto *Origanum majorana* y *Petroselinum crispum*, de las cuales se obtuvo una sola muestra. Los ejemplares fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), de su colección de germoplasma vinculada al proyecto FPTA N° 137 *Desarrollo del sector de las plantas medicinales y aromáticas en Uruguay* (Davies, 2004). Fueron usados como muestras de referencia por tener identificación taxonómica.

Además, se incluyeron muestras comerciales de algunas de las especies en estudio con el objetivo de evaluar la metodología en muestras problema. Las mismas fueron proporcionadas por el Departamento de Análisis de Productos Agropecuarios del LATU y por una empresa del ramo (Tabla 2).

Tabla 1. Descripción taxonómica de los materiales vegetales de referencia utilizados.

Nombre vulgar	Especie	Género	Familia	Orden	Clase
Ajo	<i>Allium sativum</i>	<i>Allium</i>	Amaryllidaceae	Asparagales	Liliopsida
Albahaca	<i>Ocimum sp.</i>	<i>Ocimum</i>	Lamiaceae	Lamiales	Magnoliopsida
Estragón	<i>Artemisia dracunculus</i>	<i>Artemisia</i>	Asteraceae	Asterales	Magnoliopsida
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Origanum</i>	Lamiaceae	Lamiales	Magnoliopsida
Mejorana	<i>Origanum majorana</i>	<i>Origanum</i>	Lamiaceae	Lamiales	Magnoliopsida
Perejil	<i>Petroselinum crispum</i>	<i>Petroselinum</i>	Apiaceae	Apiales	Magnoliopsida
Marcela blanca	<i>Achyrocline satureioides</i>	<i>Achyrocline</i>	Asteraceae	Asterales	Magnoliopsida
Marcela amarilla	<i>Achyrocline flaccida</i>	<i>Achyrocline</i>	Asteraceae	Asterales	Magnoliopsida
Carqueja	<i>Baccharis trimera</i>	<i>Baccharis</i>	Asteraceae	Asterales	Magnoliopsida
Cedrón	<i>Aloysia triphylla (citriodora)</i>	<i>Aloysia</i>	Verbenaceae	Lamiales	Magnoliopsida
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Thymus</i>	Lamiaceae	Lamiales	Magnoliopsida

Tabla 2. Descripción de las muestras industrializadas comerciales analizadas.

Muestra	Presentación
Albahaca	Tejido vegetal deshidratado y molido
Orégano	Tejido vegetal deshidratado y molido
Estragón	Tejido vegetal deshidratado
Tomillo	Tejido vegetal deshidratado
Perejil	Tejido vegetal deshidratado y molido
Ajo	Bulbos deshidratados en escamas y molidos
Brócoli (<i>Brassica oleracea</i>)	Tejido vegetal deshidratado y molido en cápsulas de 500 mg (equivalentes a 50 mg de Broccoli fresco)
Arándano azul (<i>Vaccinium myrtillus</i>)	Extracto de hoja de Arándano azul en cápsulas de 500 mg

Extracción de ADN

El tejido vegetal fue congelado con nitrógeno líquido y molido en mortero. Se tomó entre 0,5 y 1 g, se colocó en un tubo y se agregaron 600 µl de *buffer* de extracción (CTAB 2%, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, Tris-Cl 100 mM pH 8.0, PVP-40 2%) precalentado a 60°C y 1,2 µl de β-mercaptoetanol. Las muestras se incubaron a 60°C por 30 min, mezclando de vez en cuando. Se le agregaron 600 µl de mezcla cloroformo-álcohol

isoamílico (24:1), mezclando cuidadosamente, y se centrifugó a 10.000 rpm por 20 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue transferido a otro tubo y se agregaron 500 µl de isopropanol frío, mezclando suavemente hasta lograr la precipitación de los ácidos nucleicos. Las muestras fueron centrifugadas a 10.000 rpm por 20 min. El sobrenadante fue descartado y el *pellet* fue lavado dos veces con 500 µl de etanol 70%, seguido de una centrifugación a 10.000 rpm por 5 min. Los *pellets* se dejaron secar al aire a temperatura ambiente y luego fueron resuspendidos en 100 µl de agua milliQ® estéril y conservados en freezer a -20°C.

En el caso de algunas muestras industrializadas de origen comercial en las que se obtuvo muy bajo rendimiento de ADN utilizando el protocolo descrito anteriormente, se utilizó el *kit* comercial Nucleospin Food (Macherey – Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany), según las instrucciones del fabricante.

La evaluación de la calidad del ADN obtenido fue realizada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (w/v), y se cuantificó en Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA).

Amplificación y secuenciación

Se amplificaron las regiones cloroplásticas *rbcL* y *matK* utilizando los cebadores diseñados por Erickson y Kim respectivamente, y cuyas secuencias se describen en la Tabla 3 (CBOL Plant Working Group, 2009).

Tabla 3. Secuencias de los cebadores utilizados y tamaño esperado del amplicón generado.

Locus	Cebado	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplicón (pb)
<i>rbcL</i>	rbcLa _F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	580
<i>rbcL</i>	rbcLa _R	GTAATAATCAAGTCCACRCG	
<i>matK</i>	3F_KIM f	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG	850
<i>matK</i>	1R_KIM r	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC	

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Palm-Cycler CG1-96 (Corbett Research, Mortlake, Australia). Las condiciones de reacción para el marcador *rbcL* fueron las siguientes: se agregaron 0.5 µl de ADN molde (200 ng en promedio) en 20 µl de mezcla de reacción. La misma contenía *buffer* 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM), MgCl₂ 1.0 mM, 0.2 mM de cada dNTP, 0.5 µM de cada cebador, DMSO 2%, 0.1 µg/ µl de BSA y 1.0 U de Standard Taq Polimerasa (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización a 95°C por 3 min; 33 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 seg, unión de los cebadores a 55°C por 30 seg y extensión a 72°C por 1 min; y una extensión final a 72°C por 10 min.

Para la amplificación del marcador *matK* se tomaron 0.5 µl de ADN molde (200 ng en promedio) en 20 µl de mezcla de reacción conteniendo *buffer* 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM), MgCl₂ 1.0mM, 0.2 mM de cada dNTP, 1.0 µM de cada cebador, DMSO 4%, 0.4 µg/ µl de BSA y 2.0U de Standard Taq Polimerasa (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA). Las condiciones de reacción fueron las si-

guientes: un ciclo de desnaturalización a 94°C por 1 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 seg, unión de los cebadores a 52°C por 20 seg y extensión a 72°C por 50 seg; y una extensión final a 72°C por 5 min.

Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en *buffer* TAE (Tris- Acetato- EDTA) y visualizados por tinción con bromuro de etidio.

La purificación de los productos de PCR y la secuenciación por Sanger fueron realizadas por Macrogen Inc. (Seoul, Korea). Se utilizó un secuenciador 3730xl DNA Analyzer (Life Technologies, Carlsbad, USA). Las secuencias fueron editadas y ensambladas usando el software Geneious v. 7.1 (<http://www.geneious.com>) (Kearse et al., 2012). Se verificó la asignación de bases y la calidad de estas. En base a esto se recortaron los extremos, eliminando las posiciones en que no fue posible asignar una base (N) y aquellas cuya calidad fue muy baja. Las secuencias directa y reversa editadas, correspondientes a cada ejemplar, fueron ensambladas para dar lugar a una secuencia consenso.

Análisis de datos

Con la secuencia consenso obtenida para cada muestra se realizó la clasificación. Para ello se empleó la plataforma BOLD (<http://www.boldsystems.org>), que utiliza toda la biblioteca de secuencias estándar (*barcode*) de proyectos públicos y privados depositadas en su base de datos. En el caso de plantas, el motor de identificación de BOLD utiliza los marcadores *rbcL* y *matK* por defecto como herramienta para la clasificación, y el algoritmo BLAST en vez del algoritmo interno de BOLD. Como resultado se obtiene una lista de las noventa y nueve coincidencias más cercanas, pero no la probabilidad de clasificación en un taxón. A cada coincidencia se le asigna un porcentaje de identidad, un *score* y un valor E. La clasificación mediante BOLD no puede realizarse con ambos marcadores al mismo tiempo, es decir que se obtienen tantas asignaciones como secuencias *barcode* se utilicen (Ratnasingham y Hebert, 2007; Ratnasingham y Hebert, 2011; Boldsystems, 2019). A partir del listado de coincidencias que arroja la herramienta de identificación de BOLD, se definió como coincidencia más cercana el espécimen con mayor porcentaje de identidad, tomando como límite de aceptación arbitrario un 99,5%. En la mayoría de los casos este correspondió a la secuencia con mayor *score*. En las búsquedas en las que se obtuvieron múltiples coincidencias con igual porcentaje de identidad, se reportó el espécimen más cercano a la especie de referencia cuando fue posible. A su vez se registró la coincidencia más cercana perteneciente al mismo género (VMCIG) y la más cercana perteneciente a otro género (VMCDG).

Las muestras de referencia fueron utilizadas para validar la identificación taxonómica. La secuencia se consideró correctamente asignada cuando la especie a la que pertenece obtuvo el mayor *score* entre todos los candidatos. Se consideró una falla en la asignación cuando la especie correcta obtuvo un *score* menor o igual a otras especies.

Para el análisis de los datos de secuencias y especímenes, y como forma de validar la identificación, se utilizó la herramienta Taxon ID Tree disponible en BOLD. Esta permite la construcción de dendogramas usando el algoritmo *Neighbour Joining*. Las secuencias fueron alineadas con MUSCLE y para calcular las distancias se utilizó el modelo *Kimura 2 Parameter*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó la aplicabilidad de la metodología del Código de Barras de ADN (*DNA Barcoding*) para la clasificación de muestras de hierbas de uso medicinal y de la industria alimentaria. Se utilizaron los marcadores recomendados por el grupo de trabajo de plantas del CBOL, *rbcL* y *matK*. *rbcL* comprende una región de 599 pares de bases ubicada en la región 5' del gen que codifica para la ribulosa bifosfato carboxilasa (RuBisCO), localizada entre las bases 1 - 599 en la secuencia del gen en *Arabidopsis thaliana*. (Mondal, et al., 2013). Es sencilla de amplificar, secuenciar y alinear en la mayoría de las plantas. A pesar de su bajo poder de discriminación, se la considera importante por tratarse de una región de referencia muy usada en estudios filogenéticos que permite reconstruir relaciones entre especímenes a nivel de familia y género (Kress y Erickson, 2007). La región *matK* comprende 841 bases en el centro del gen que codifica para la enzima madurasa K. Se encuentra ubicada entre las bases 205 y 1046 en la secuencia completa del gen en el genoma plastídico de *A. thaliana*. Su tasa de sustitución es tres veces más alta que la de *rbcL* a nivel de nucleótidos y seis veces mayor a nivel de aminoácidos, lo que muestra que es un gen de rápida evolución. A diferencia de *rbcL*, *matK* resulta más difícil de amplificar, particularmente en las plantas que no son angiospermas. Pero debido a su rápida evolución, es la más parecida a CO1 (la región estándar usada en animales), brindando un alto poder de discriminación en plantas (Vijayan, et al., 2010).

Con el protocolo de extracción de ADN puesto a punto, se pudo extraer ADN en cantidad considerable de todos los tejidos frescos (entre 114 y 2800 ng/ μ L), siendo la muestra de *Ocimum* sp. de la que se obtuvo menos cantidad (114 ng/ μ L). En todos casos la calidad del ADN extraído fue buena ($A_{260/280}$ entre 1,4 y 3,2). En el caso de las muestras comerciales en las que los tejidos vegetales fueron sometidos a algún tipo de procesamiento (deshidratación, molienda, extracción), el rendimiento fue bueno (entre 40 y 2300 ng/ μ L) y también la calidad ($A_{260/280}$ entre 1,4 y 2,3), excepto para las muestras de arándano en cápsulas y ajo en escamas. En estos dos casos se volvió a extraer el ADN usando un *kit* comercial basado en el uso de sales caotrópicas, agentes desnaturalizantes y detergentes en el *buffer* de lisis, y la adsorción del ADN a una membrana de sílica, lo que permitió la remoción de impurezas mediante lavados de la membrana con *buffer*. Con este procedimiento se logró mejorar el rendimiento en ambas muestras y la pureza del ADN extraído del ajo en escamas, pero no del proveniente del arándano, lo cual tiene sentido por la alta concentración de polifenoles que contienen los ejemplares de esta especie en sus hojas y frutos.

Con respecto a la amplificación de la región *rbcL*, con el protocolo puesto a punto se analizaron 29 muestras de referencia (tejido fresco) pertenecientes a las familias *Amaryllidaceae*, *Apiaceae*, *Astereaceae*, *Lamiaceae*, *Verbenaceae*. En todos los casos se obtuvieron productos de amplificación del tamaño esperado. Fueron analizadas 9 muestras industrializadas de origen comercial de perejil, tomillo, albahaca, estragón, orégano, ajo en escamas, ajo molido, brócoli y arándano en las presentaciones que se detallan en la Tabla 2. En todos los casos se obtuvieron

productos de amplificación, excepto a partir de la muestra de arándano que no amplificó. Este hecho era de esperar ya que en la extracción se obtuvo poco ADN y de baja pureza. De acuerdo con los resultados obtenidos podemos corroborar que los cebadores *rbcLa_f* y *rbcLa_rev* funcionan adecuadamente en nuestras condiciones de trabajo y para las especies estudiadas.

En cuanto a la secuenciación de los productos de amplificación de *rbcL*, se obtuvieron secuencias de buena calidad en el 83% de las muestras de referencia. El largo promedio de las secuencias fue de 575 bases, siendo muy similar en todas las especies analizadas. En el caso de las muestras comerciales industrializadas, el 50% de las secuencias obtenidas fueron de calidad aceptable. Las muestras de albahaca y estragón debieron ser amplificadas y secuenciadas en una segunda instancia, con lo que se logró mejorar la calidad.

Los resultados obtenidos para la región *rbcL* avalan las conclusiones del estudio realizado por el grupo de plantas del CBOL en las especies estudiadas en este trabajo. Este *locus* es fácilmente amplificable con los cebadores disponibles, lo que confirma su universalidad, y las secuencias generadas son de buena calidad en general, requiriendo poca edición manual (CBOL Plant Working Group, 2009).

Con el protocolo puesto a punto para la amplificación de la región *matK* se analizaron 29 muestras de referencia pertenecientes a las familias *Amaryllidaceae*, *Apiaceae*, *Astereaceae*, *Lamiaceae*, *Verbenaceae*. En el 86% de los casos se obtuvieron productos de amplificación del tamaño esperado. La amplificación falló en las especies *Origanum majorana*, *Origanum vulgare* y *Ocimum* pertenecientes a la familia de las Lamiaceas. En estos casos se repitió la amplificación partiendo de la mitad de la concentración de ADN (100 ng), obteniéndose amplicones del tamaño esperado. Al amplificar el ADN de las muestras comerciales no se obtuvieron productos de amplificación para la muestra de arándano. Con las muestras de albahaca y orégano fue necesaria una segunda amplificación.

Las secuencias *matK* obtenidas para las muestras de referencia fueron de mediana y baja calidad en el 37% de los casos. En todas las secuencias se observó una pérdida de resolución alrededor de las 500 bases. El largo promedio fue de 793 bases, observándose mucha variación en la longitud de las secuencias entre muestras. A partir de los tres amplicones originados de las tres muestras de *Ocimum* sp, se obtuvieron secuencias para dos muestras, las cuales debieron ser amplificadas y secuenciadas nuevamente para mejorar la intensidad de señal y calidad de las secuencias. Esta situación se repitió con las secuencias de una muestra de *Thymus vulgaris* y la de *Petroselinum crispum*. A partir del fragmento amplificado de una de las muestras de *Origanum vulgare* no se obtuvo secuencia. Las secuencias obtenidas en el 35% de las muestras comerciales fueron de calidad aceptable. El amplicón obtenido a partir de la muestra de albahaca fue secuenciado nuevamente, pero no se logró mejorar la calidad del resultado.

Varios autores han reportado dificultades en la amplificación y la obtención de secuencias bidireccionales de buena calidad de la región *matK* en distintas especies (Fazekas, et al., 2008; Kressy Erickson, 2007; Hollingsworth, et al., 2011; Theodoridis, et al., 2012). Este hecho fue corroborado en el estudio, observándose dificultades para la amplificación y secuenciación de esta región, tanto en las muestras de teji-

do fresco como en las procesadas. A pesar de ello, *matK* sigue siendo considerada como región de referencia junto a *rbcL* por el CBOL *Plant Group*, debido a que es una de las regiones codificantes del genoma plastídico que evoluciona más rápidamente, lo que le da un gran poder de discriminación entre especies (CBOL Plant Working Group, 2009; Hollingsworth, et al., 2011).

Por otra parte, las dificultades encontradas con la amplificación y secuenciación de *rbcL* y *matK*, sobre todo en muestras comerciales, podría resolverse utilizando la estrategia del *mini-barcoding*. Se basa en la amplificación de fragmentos más pequeños (<200 pb), lo cual resolvería los inconvenientes que se presentan en los productos botánicos industrializados en los que la estructura del ADN puede estar alterada debido al procesamiento de los tejidos vegetales (Gao, et al., 2019).

Con las secuencias bidireccionales obtenidas y editadas manualmente, se generó una secuencia consenso para cada muestra y cada *locus*. Con ellas se llevó a cabo la identificación en la base de datos de *Barcode of Life* (BOLD) de cada marcador por separado, ya que el motor de identificación de BOLD no está diseñado para utilizar ambos marcadores en la misma instancia, pese a que se recomienda el uso de dos *loci* para plantas. Se reportó la coincidencia más cercana, el/los vecinos más cercanos de igual género (VMCIG), y el/los vecinos más cercanos pertenecientes a otros géneros (VMCDG), clasificados según su *score* y porcentaje de identidad con la secuencia problema. El criterio utilizado para considerar que la secuencia correspondiente a la muestra de referencia fuera correctamente asignada a la especie a la que pertenece, fue que la misma obtuviera el mayor *score* entre las noventa y nueve coincidencias reportadas por la base de datos. Se consideró una falla en la asignación cuando la especie correcta obtuvo un *score* menor o igual al de las otras especies. En los casos en que la diferencia entre los *scores* no era significativa (menor o igual a 2), se tomó en cuenta el porcentaje de identidad para reforzar el criterio. Por último, se informó la especie/género asignado de acuerdo con los datos obtenidos. En las Tablas 4 y 5 se reportan los resultados obtenidos a partir de las muestras utilizadas como referencia. Se unificaron los resultados de las tres muestras analizadas de cada especie para que fuera más sencilla la interpretación de las tablas.

En las Tablas 6 y 7 se presentan los resultados obtenidos de la comparación en BOLD de las secuencias obtenidas para las muestras comerciales para ambos marcadores. En este caso se analizaron los resultados de la identificación con el mismo criterio que para las muestras de referencia, pero en las comerciales no se corroboró la especie declarada por el fabricante mediante una identificación taxonómica. Por este motivo, con la identificación obtenida mediante la comparación de secuencias en BOLD, corroboramos si la misma coincidía o no con la especie declarada por el fabricante.

De los 29 haplotipos *rbcL* obtenidos para las muestras de referencia, 12 pudieron asignarse correctamente a nivel de especie, 10 a nivel de género y 7 a nivel de familia. Esto representa un 41,4% de asignación correcta a nivel de especie. De los 27 haplotipos *matK* obtenidos para las muestras de referencia, 14 pudieron asignarse correctamente a nivel de especie, 4 a nivel de género y 9 a nivel de familia. Esto representa un 51,9 9% de asignación correcta a nivel de especie. En la Fi-

gura 1 se pueden observar los porcentajes de acierto en la identificación por región, tanto a nivel de especie, género o aquellos ejemplares que no pudieron identificarse.

Tabla 4. Clasificación de muestras de referencia mediante BOLD usando secuencias del locus *rbcL* (%ID: porcentaje de identidad, VMCI: vecino más cercano de igual género, VMCDG: vecino más cercano de distinto género, *: no se encontraron vecinos más cercanos de distinto género, **: no se pudo asignar especie ni género).

Especie de la muestra	Mejor coincidencia	% ID	VMCI	% ID	VMCDG	% ID	Asignación
<i>Allium sativum</i>	<i>Allium sativum</i>	100	<i>Allium ursinum</i>	99.6	*	*	<i>A. sativum</i>
<i>Ocimum sp.</i>	<i>Ocimum tenuiflorum</i> <i>/O. americanum</i> <i>/O.kilimandscharicum</i> <i>/Ocimum sp.</i>	100	<i>Ocimum sanctum</i> <i>/O.tenuiflorum</i>	100	<i>Plectranthus barbatus</i> <i>/Coleus blumei</i> <i>/Solenostemon scutellarioides</i> <i>/Anisochilus carnosus</i> <i>/Ortosiphon stamineus</i> <i>/Clerodendrathus spicatus</i> <i>/Plectranthus mollis</i>	99.6	<i>Ocimum</i>
<i>Baccharis trimera</i>	<i>Baccharis trimera</i>	100	<i>Baccharis trinervis</i>	99.8	<i>Symphytotrichum novae-angliae</i>	99.6	<i>B. trimera</i>
<i>Aloysia triphylla</i>	<i>Aloysia citrodora</i>	100	<i>Lippia stochadifolia</i> <i>/L. myriocephala</i> <i>/L. stochadifolia</i>	98.5	<i>Acantholippia seriphoides</i>	99.4	<i>A. citrodora</i>
<i>Artemisia dracuncululus L</i>	<i>Artemisia dracuncululus</i>	99.9	<i>Artemisia annua</i> <i>/A.frigida</i> <i>/A.lavandulifolia</i> <i>/A.gmelinii</i> <i>/A.scoparia</i>	99.8	<i>Chrysanthemum indicum</i> <i>/C. morifolium</i>	99.6	<i>Artemisia</i>
<i>Achyrocline satureioides</i>	<i>Gnaphalium</i>	99.8	<i>Gnaphalium sylvaticum</i> <i>/G.norvegicum</i> <i>/G.supinum</i>	99.5	<i>Helichrysum cymosum</i> <i>/Helychrisum populifolium</i> <i>/H.kraussii</i> <i>/Metalasia densa</i>	99.8	**
<i>Achyrocline flaccida</i>	<i>Gnaphalium</i>	99.8	<i>Gnaphalium uliginosum</i>	99.2	<i>Annaphilis margaritacea</i> <i>/Antennaria neglecta</i>	99.4	**
<i>Origanum majorana</i>	<i>Origanum majorana</i>	100	<i>Origanum vulgare</i>	100	<i>Ocimum sp</i>	100	**
<i>Origanum vulgare</i>	<i>Origanum vulgare</i>	100	<i>Origanum majorana</i>	100	<i>Ocimum sp</i>	100	**
<i>Petroselinum crispum</i>	<i>Petroselinum crispum</i>	100	<i>Petroselinum segetum</i>	99.0	<i>Sium suave</i> <i>/Anethum graveolens</i>	98.8	<i>P. crispum</i>
<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	100	<i>Thymus quinquecostatus</i>	99.6	<i>Bystropogon origanifolius</i> <i>/Mentha spicata</i>	99.8	<i>T. vulgaris</i>

Tabla 5. Clasificación de muestras de referencia mediante BOLD usando secuencias del *locus matK* (%ID: porcentaje de identidad, VMCIG: vecino más cercano de igual género, VMCDG: vecino más cercano de distinto género, *: no se encontraron vecinos más cercanos de distinto género, **: no se pudo asignar especie ni género).

Especie de la muestra	Mejor coincidencia	% ID	VMCIG	% ID	VMCDG	% ID	Asignación
<i>Allium sativum</i>	<i>Allium sativum</i>	100	<i>A. vineale</i> / <i>A. scorodoprasum</i> / <i>A. ampeloprasum</i>	99.1	<i>Mesua ferrea</i>	96.1	<i>Allium sativum</i>
<i>Ocimum sp.</i>	<i>Ocimum sp.</i>	100	<i>O. citrodorum</i> / <i>O. kilimandscharicum</i> / <i>O. basilicum</i>	99.7	<i>Mentha spicata</i>	99.7	<i>Ocimum</i>
<i>Baccharis trimera</i>	<i>Baccharis trimera</i>	100	<i>Baccharis trinervis</i>	99.5	<i>Oclemena nemoralis</i> / <i>Aster umbellatus</i> / <i>A. ontarionis</i>	99.6	<i>Baccharis trimera</i>
<i>Aloysia triphylla</i>	<i>Aloysia citrodora</i>	100	<i>Lippia stoehadifolia</i>	97.2	<i>Lantana camara</i>	97.5	<i>Aloysia citrodora</i>
<i>Artemisia dracunculus L</i>	<i>Artemisia dracunculus</i>	100	<i>A. frigida</i> / <i>A. alaskana</i> / <i>A. rupestris</i> / <i>A. norvegica</i> / <i>A. borealis</i> / <i>A. capillaris</i> / <i>A. glomerata</i> / <i>A. hyperborea</i> / <i>A. campestris</i> / <i>A. biennis</i>	99.3	<i>Chrysanthemum indicum</i> / <i>C. lavandulifolium</i> / <i>Ajnia gracilis</i>	99.1	<i>Artemisia dracunculus</i>
<i>Achyrocline satureioides</i>	<i>Gnaphalium</i>	100	*		<i>Helichrysum/Metalasia densa/Senecio</i>	100	**
<i>Achyrocline flaccida</i>	<i>Gnaphalium</i>	100	<i>Gnaphalium luteoalbum</i>	99.2	<i>Helichrysum petiolare</i> / <i>Metalasia densa</i> / <i>Senecio</i>	100	**
<i>Origanum majorana</i>	<i>Origanum majorana</i>	100	<i>Origanum vulgare</i>	100	<i>Thymus vulgaris</i> / <i>T. caespitosus</i>	99.6	**
<i>Origanum vulgare</i>	<i>Origanum vulgare</i>	99.9	<i>Origanum sp.</i> / <i>O. majorana</i> / <i>O. microphyllum</i> / <i>O. dayi</i> / <i>O. elongatum</i> / <i>O. rotundifolium</i> / <i>O. dictamnus</i>	99.2	<i>Thymus vulgaris</i> / <i>T. caespitosus</i>	99.6	<i>Origanum vulgare</i>
<i>Petroselinum crispum</i>	<i>Petroselinum crispum</i>	100	<i>Petroselinum segetum</i>	100	<i>Apium graveolens</i>	99.4	<i>Petroselinum</i>
<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	100	<i>T. striatus</i> / <i>T. spinulosus</i> / <i>T. polytrichus</i> / <i>T. longicaulis</i> / <i>T. serpyllum</i> / <i>T. striatus</i> / <i>T. spinulosus</i> / <i>T. sipyleus</i> / <i>T. pulegioides</i>	99.7	<i>Origanum sp.</i> / <i>O. vulgare</i> / <i>O. onites</i>	99.2	<i>Thymus vulgaris</i>

Estos resultados concuerdan con lo expuesto por varios autores con respecto al poder discriminatorio de *rbcL* con respecto a *matK*. *rbcL* es un marcador muy utilizado en estudios filogenéticos de plantas por su robustez para ubicar un espécimen no identificado en la familia, el género y en algunos casos la especie a la que pertenece. Su poder discriminatorio es menor, especialmente en aquellos géneros ricos en especies como ocurre en angiospermas (Kress y Erickson, 2007) y (CBOL Plant Working Group, 2009).

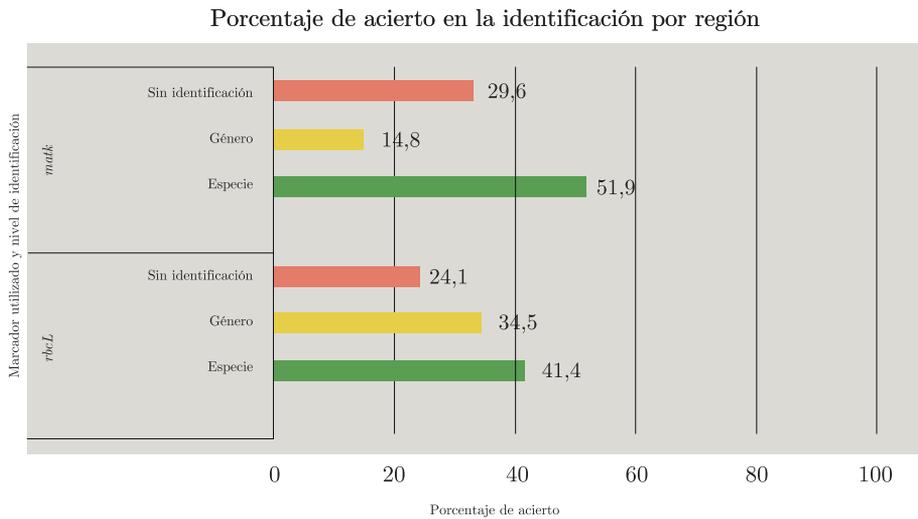


Figura 1. Porcentaje de acierto en la identificación de las muestras de referencia utilizando *rbcL* o *matK*

El mismo procedimiento fue realizado con las muestras comerciales. Los resultados obtenidos se presentan en las Tablas 6 y 7. Como puede observarse, con ambos marcadores la mejor coincidencia para la muestra de ajo molido corresponde a la especie declarada por el fabricante. Lo mismo sucedió con el ajo en escamas con el marcador *matK*. La muestra de estragón no pudo asignarse correctamente usando el marcador *rbcL*, pero con *matK* la asignación coincidió con la especie declarada. Con la muestra de perejil la situación fue la inversa, *rbcL* fue más eficiente para permitir la asignación que *matK*. El brócoli en cápsulas pudo asignarse correctamente a nivel de género, pero no de especie. Tanto la albahaca como el orégano no pudieron diferenciarse de otras especies pertenecientes a la familia de las Lamiaceas mediante el uso de estos marcadores.

Tabla 6. Clasificación de muestras comerciales mediante BOLD usando secuencias del marcador *rbcL* (%ID: porcentaje de identidad, VMCI: vecino más cercano de igual género, VMCDG: vecino más cercano de distinto género).

Especie declarada	Mejor coincidencia	% ID	VMCI	% ID	VMCDG	% ID	Especie/Género asignado
Ajo molido	<i>Allium sativum</i>	98.5	<i>Allium scorodoprasum</i>	98.5	<i>Ocimum basilicum</i>	97.8	Allium
Albahaca	<i>Ocimum basilicum</i>	99.5	<i>Ocimum kilimadcharicum/O. americanum/O. tenuiflorum</i>	99.5	<i>Origanum majorana/Mentha sp</i>	99.5	No se puede asignar especie ni género
Estragón	<i>Artemisia dracunculus</i>	99.8	<i>Artemisia vulgaris/A. absinthiu/A. annua/A. campestris</i>	99.8	<i>Tanacetum atkinsonii/Jacobaea gibbosa/Hulteniella integrifolia</i>	99.8	No se puede asignar especie ni género
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	99.0	<i>Origanum majorana/O. onites/O. siphyleum/O. dictamnus</i>	99.0	<i>Satureja vulgaris/Pycnanthemum verticillatum</i>	99.0	No se puede asignar especie ni género
Perejil	<i>Petroselinum crispum</i>	99.6	<i>Petroselinum segetum</i>	98.8	<i>Amni seubertianum/A. trifoliatum/A. majus</i>	99.5	<i>P. crispum</i>

Tabla 7. Clasificación de muestras comerciales mediante BOLD usando secuencias del marcador *matK* (%ID: porcentaje de identidad, VMCIG: vecino más cercano de igual género, VMCDG: vecino más cercano de distinto género, *: no se encontró mejor coincidencia).

Muestra	Mejor coincidencia	% ID	VMCIG	% ID	VMCDG	% ID	Especie/Género asignado
Ajo molido	<i>Allium sativum</i>	99.6	<i>Allium scorodoprasum</i>	99.3	<i>Mesua ferrea</i>	96.1	<i>Allium sativum</i>
Ajo en escamas	<i>Allium sativum</i>	99.4	<i>Allium vineale</i> / <i>A.s. corodoprasum</i> / <i>A. ampeloprasum</i>	98.8	<i>Mesua ferrea</i>	95.7	<i>Allium sativum</i>
Albahaca	*		*		<i>Amaranthus</i>	98.8	No se puede asignar especie ni género
Broccoli	<i>Brassica oleracea</i>	100	<i>Brassica napus/B.rapa</i>	100	<i>Raphanus raphanistrum</i>	99.3	<i>Brassica</i>
Estragón	<i>Artemisia dracunculus</i>	99.4	<i>Artemisia annua</i> / <i>A. kruhsiana</i>	98.5	<i>Hulteniella integrifolia</i>	98.8	<i>Artemisia dracunculus</i>
Perejil	<i>Petroselinum crispum</i>	99.6	<i>Petroselinum segetum</i>	99.6	<i>Apium graveolens</i>	99.2	<i>Petroselinum</i>

Las secuencias obtenidas para las muestras de referencia y las comerciales fueron utilizadas para construir un dendograma basado en el algoritmo *Neighbor Joining* y el modelo de cálculo de distancias *Kimura 2 Parameter*, para cada marcador (Figuras 2 y 3). Esta herramienta se utilizó como forma de validar el agrupamiento de las muestras en conjuntos o *clusters* a partir de sus secuencias *barcode*.

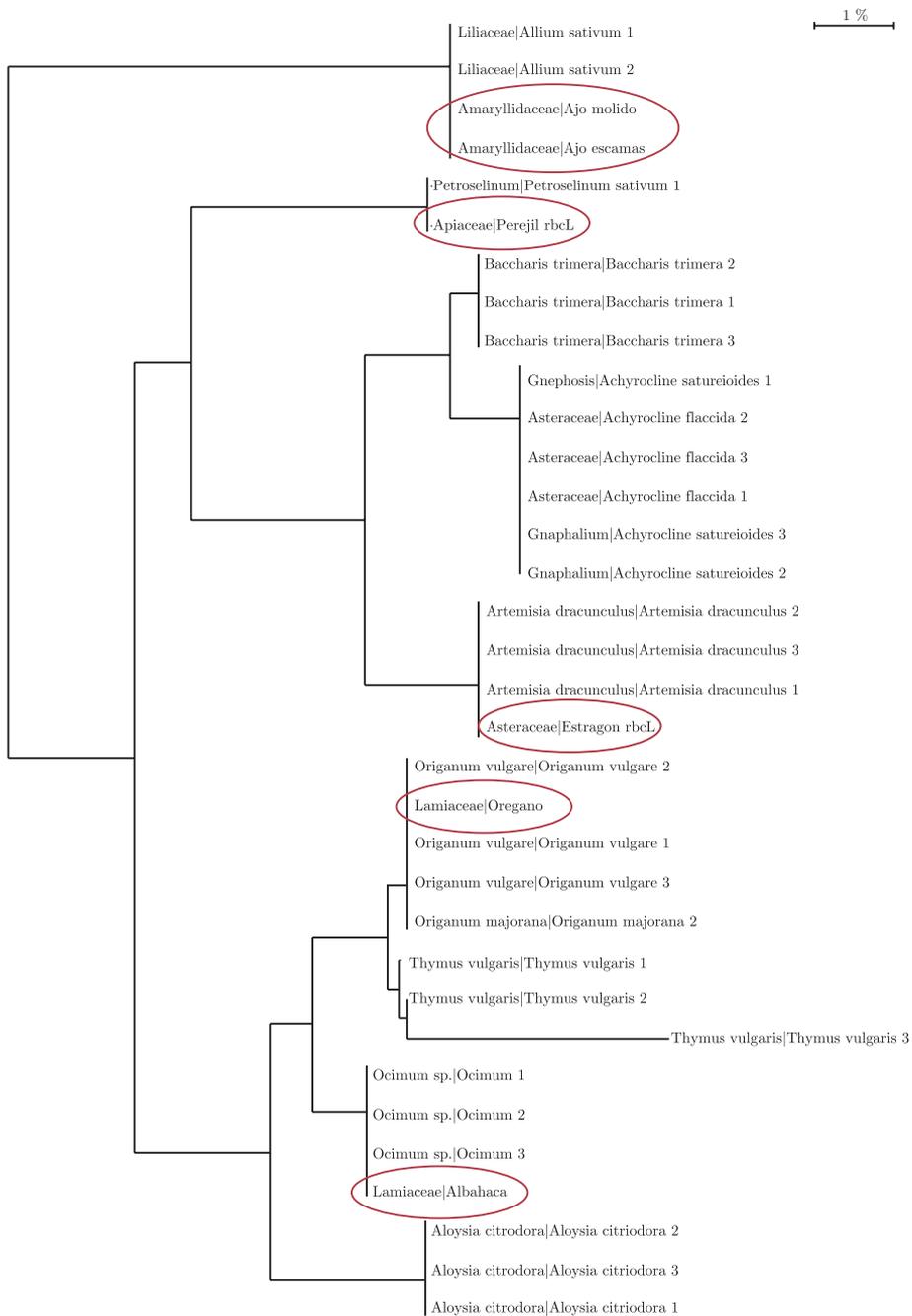


Figura 2. Dendrograma en el algoritmo *Neighbor Joining* y el modelo de cálculo de distancias *Kimura 2 Parameter* construido a partir de las secuencias *rbcL* de las muestras de referencia y comerciales. Los círculos rojos señalan la ubicación de las muestras comerciales en el *cluster* correspondiente.

Las secuencias *rbcL* se agruparon correctamente por género (Figura 2). En aquellos géneros donde se analizó más de una especie, como *Achyrocline* y *Origanum*, las distintas especies fueron agrupadas en el mismo *cluster*. Las secuencias correspondientes a las muestras comerciales coincidieron con los *clusters* de las especies declaradas en cada caso.

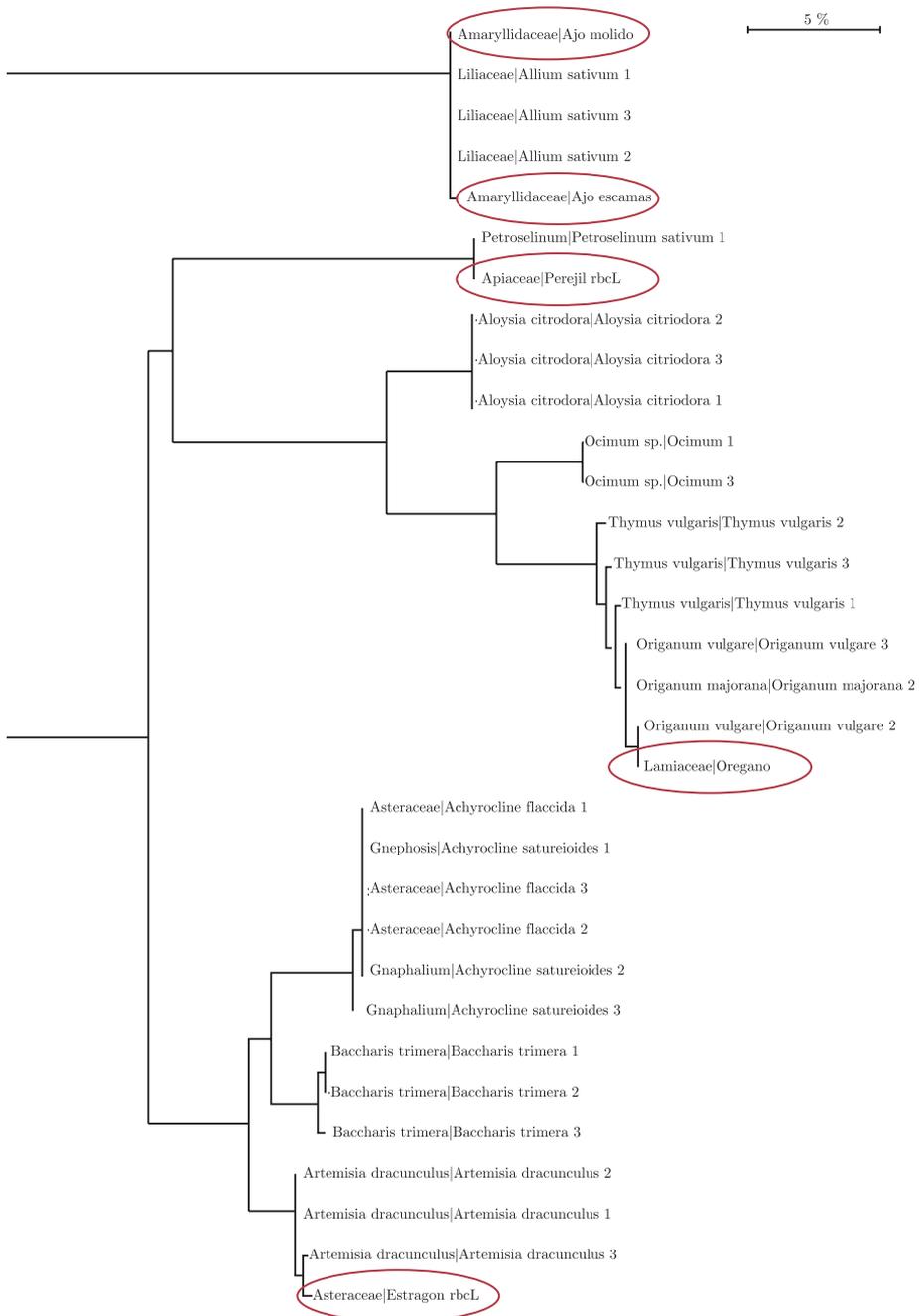


Figura 3. Dendrograma basado en el algoritmo *Neighbor Joining* y el modelo de cálculo de distancias *Kimura 2 Parameter* construido a partir de las secuencias *matK* de las muestras de referencia y comerciales. Los círculos rojos señalan la ubicación de las muestras comerciales en el *cluster* correspondiente.

Las secuencias *matK* de las muestras de referencia se agruparon de la misma forma que fue descrita para las secuencias *rbcL* (Figura 3). Las secuencias fueron agru-

padas en *clusters* separados por género, excepto las correspondientes a *Origanum* y *Thymus* que comparten el mismo *cluster*. Las secuencias correspondientes a las muestras comerciales fueron agrupadas en los *clusters* correspondientes a las especies declaradas.

Estos resultados son concordantes con los presentados en las Tablas 4 y 5, es decir que la asignación a la especie correcta en las muestras analizadas es relativamente baja, y que la discriminación de muestras pertenecientes a especies muy cercanas no fue lograda.

Fazekas y colaboradores (2009) reportaron que la habilidad de las regiones *barcode* para discriminar entre especies es menor en plantas que en animales, lo cual estaría asociado al hecho de que los límites entre especies son más difusos en las primeras. Esto se debe a fenómenos que ocurren en plantas, como la reproducción asexual, poliploidía e hibridación. En estudios realizados encontraron que las especies monofilicas bien soportadas son menos comunes en plantas, y que la brecha entre distancias genéticas intra e interespecíficas es menos pronunciada que en animales. Como resultado de estos hechos, discriminar entre especies de plantas usando *barcodes* simples o *multilocus* a partir del genoma plastídico sigue siendo un desafío (Fazekas, et al., 2009).

Según Hollingsworth y otros (2011), para que el Código de Barras de ADN funcione correctamente en plantas se requiere que haya transcurrido suficiente tiempo desde la especiación, a fin de que las mutaciones o la deriva conduzcan a un grupo de caracteres que agrupen a individuos pertenecientes a la misma especie. En clados en los que la especiación es muy reciente o las tasas de mutaciones son muy bajas, es muy probable que las secuencias *barcode* se compartan entre especies relacionadas. Un ejemplo de esta situación se da en el género *Origanum*. En nuestro estudio lo incluimos por la importancia de sus especies en el uso culinario, cosmético y medicinal, y con el objetivo de diferenciar entre dos especies muy cercanas: *Origanum vulgare* y *Origanum majorana*. Los resultados que obtuvimos concuerdan con las conclusiones de un trabajo realizado por De Mattia y otros (2011). Este es un género que muestra una gran promiscuidad genética. En general, se dan eventos de hibridación entre distintas especies, por lo que la diversidad genética intraespecífica es mayor que la interespecífica, lo que hace que el enfoque del *barcoding* no sea aplicable ya que no permite discriminar entre ambas especies (De Mattia, et al., 2011). *Thymus* es otro género en el que las diferencias entre taxones muy relacionados se limitan a pocos caracteres, lo que hace que sean difíciles de asignar a una especie (Galimberti, et al., 2014; Federici, et al., 2015).

CONCLUSIONES

Con el presente trabajo se buscó demostrar la factibilidad de aplicación de técnicas moleculares basadas en ADN conformes con la estrategia del Código de Barras de ADN para la clasificación de muestras de especias y hierbas medicinales, frescas e industrializadas.

De acuerdo con lo que se había planteado, se puso a punto la extracción de ADN de este tipo de muestras, así como la amplificación y secuenciación de regio-

nes *barcode* propuestas por el grupo de trabajo de plantas del *Consortium for the Barcode of Life*, *rbcL* y *matK*.

Se utilizó la plataforma *Barcode of Life Data Systems* (BOLD) para validar la clasificación de muestras de referencia de especies conocidas y ubicar muestras problema en grupos de referencia. Se observó que la clasificación de muestras desconocidas es más difícil de lo esperado, especialmente si las muestras de referencia corresponden a poblaciones distintas que las muestras problema.

Una de las principales limitantes es la cobertura a nivel taxonómico de las bases de datos de referencia. Para que esta metodología sea factible de aplicar a nivel industrial, resulta fundamental la existencia de una base de datos global curada que contenga una gran cantidad de secuencias *barcode* de referencia pertenecientes a distintas poblaciones de las mismas especies. Esto aseguraría una representación de la variabilidad genética dentro de cada especie, haciendo posible la diferenciación de muestras pertenecientes a especies cercanas.

REFERENCIAS

- Boldsystems, 2019. *Barcode of life data systems handbook. A web-based bioinformatics platform supporting the DNA barcoding of animal, plant, and fungal species* [En línea]. 1er borrador. [s.l.]: BOLD [Consulta: 22 de mayo de 2020]. Disponible en: http://www.boldsystems.org/libhtml_v3/static/BOLD4_Documentation_Draft1.pdf
- Bruni, I., De Mattia, F., Galimberti, A., Galasso, G., Banfi, E., Casiraghi, M. y Labra, M., 2010. Identification of poisonous plants by DNA barcoding approach. En: *International Journal of Legal Medicine*, 124(6), pp.595-603. doi:10.1007/s00414-010-0447-3
- CBOL Plant Working Group, 2009. A DNA barcode for land plants. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences USA (PNAS)*, 106(31), pp.12794-12797. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.0905845106>
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Zhu, Y., Ma, X., Gao, T., Pang, X., Luo, K., Li, Y., Li, X., Jia, X., Lin, Y. y Leon, C., 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. En: *PLoS ONE*, 5(1). doi:10.1371/journal.pone.0008613
- Coutinho Moraes, D., Still, D., Lum, M. y Hirsch, A., 2015. DNA-based authentication of botanicals and plant-derived dietary supplements: where have we been and where are we going? En: *Planta Med.*(81), pp.687-695. doi:<http://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1545843>
- Davies, P., 2004. *Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas* [En línea]. Montevideo: INIA. [Consulta: 4 de abril de 2008]. Disponible en: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/2810/1/15630041107070839.pdf>

- De Mattia, F., Bruni, I., Galimberti, A., Cattaneo, F., Casiraghi, M. y Labra, M., 2011. A comparative study of different DNA barcoding markers for the identification of some members of Lamiaceae. En: *Food Research International*, 44(3), pp.693-702. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.032>
- EFSA Scientific Committee, 2009. Guidance on safety assessment of botanicals and botanical preparations intended for use as ingredients in food supplements. En: *EFSA Journal*, 7(9), 1249. doi:[doi:10.2093/j.efsa.2009.1249](https://doi.org/10.2093/j.efsa.2009.1249)
- Fazekas, A., Burgess, K., Kesanakurti, P., Graham, S., Newmaster, S., Husband, B. y Barrett, S., 2008. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. En: *PLoS One*, 3(7), e2802. doi:[10.1371/journal.pone.0002802](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002802)
- Fazekas, A., Kesanakurti, P., Burgess, K.S., Percy, D., Graham, S.W. y Barrett, S.C., 2009. Are plant species inherently harder to discriminate than animal species using DNA barcoding markers? En: *Molecular Ecology Resources*, 9(suppl. 1), pp.130-139. doi:[10.1111/j.1755-0998.2009.02652.x](https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02652.x)
- Federici, S., Fontana, D., Galimberti, A., Bruni, I., de Mattia, F., Cortis, P. y Labra, M. 2015. A rapid diagnostic approach to identify poisonous plants using DNA barcoding data. En: *Plant Biosystems*, 149(3), pp.537-545. doi:<https://doi.org/10.1080/11263504.2014.941031>
- Frigerio, J., Gorini, T., Galimberti, A., Bruni, I., Tommasi, N., Mezzasalma, V. y Labra, M., 2019b. DNA barcoding to trace medicinal and aromatic plants from the field to the food supplement. En: *Journal of Applied Botany and Food Quality*,(92), pp.33-38. doi:[10.5073/JABFQ.2019.092.005](https://doi.org/10.5073/JABFQ.2019.092.005)
- Galimberti, A., Labra, M., Sandionigi, A., Bruno, A., Mezzasalma, V. y De Mattia, F., 2014. DNA barcoding for minor crops and food traceability. En: *Advances in Agriculture*. doi:<https://doi.org/10.1155/2014/831875>
- Gao, Z., Liu, Y., Wang, X., Wei, X., y Han, J., 2019. DNA mini-barcoding: a derived barcoding method for herbal molecular identification. En: *Frontiers in Plant Science*, 10, pp.987. doi: [10.3389/fpls.2019.00987](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00987)
- Hebert, P., Cywinska, A., Ball, S. y deWaard, J., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. En: *Proceedings of the Royal Society B*, (270), pp.313-321. doi:[10.1098/rspb.2002.2218](https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218)
- Heubl, G., 2010. New aspects of DNA-based authentication of chinese medicinal plants by molecular biological techniques. En: *Planta Medica*, 76(17), pp.1963-1974. doi:[10.1055/s-0030-1250519](https://doi.org/10.1055/s-0030-1250519)

- Hollingsworth, P., Graham, S. y Little, D., 2011. Choosing and using a plant DNA barcode. En: *PLoS One*, 6(5), e19254. doi:10.1371/journal.pone.0019254
- Ichim, M., 2019. The DNA-based authentication of commercial herbal products reveals their globally widespread adulteration. En: *Frontiers in Pharmacology*, 10. doi: 10.3389/fphar.2019.01227
- Joshi, K.C., 2004. Molecular markers in herbal drug technology. En: *Current Science*, 87, pp.159-165.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S. y Drummond, A., 2012. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. En: *Bioinformatics*, 28(12), pp.1647-1649.
- Kool, A., de Boer, H., Krüger, A., Rydberg, A., Abbad, A., Björk, L. y Martin, G., 2012. Molecular Identification of Commercialized Medicinal Plants in Southern Morocco. En: *PLoS One*, 7(6). doi:10.1371/journal.pone.0039459
- Kress, W., 2017. Plant DNA barcodes: applications today and in the future. En: *Journal of Systematics and Evolution*, 55(4), pp.291-307. doi:10.1111/jse.12254
- Kress, W. y Erickson, D., 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding rbcL gene complements the non-coding trnH-psbA spacer region. En: *PLoS ONE*, 2(6), e508. doi:10.1371/journal.pone.0000508
- Liu, M., W., L.X., Liao, B.L., L. y Ren, Y., 2019. Species identification of poisonous medicinal plant using DNA barcoding. En: *Chinese Journal of Natural Medicines*, 17(8), pp.0585-0590
- Lu, Z., Thompson, C., Chua, T., Babajanian, S., Zhang, Y., Gao, Q., Chang, P. y Swanson, G., 2019. Single-laboratory validation of a two-tiered DNA Barcoding method for raw botanical identification. En: *Journal of AOAC International*, 102(5), pp.1435-1447. doi:https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0130
- Mondal, S., Shit, S. y Kundu, S., 2013. A comparative computational study of the rbcL gene in plants and in the three prokaryotic families—Archae, cyanobacteria and proteobacteria. En: *Indian Journal of Biotechnology*, 12, pp.58-66.
- Newmaster, S., Fazekas, A.J., Steeves, A. y Janovec, J., 2007. Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae. En: *Molecular Ecology Notes*, 8(3), pp.480-90 doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.02002.x

- Newmaster, S., Grguric, M., Shammughanandhan, D., Ramalingam, S. y Ragupathy, S., 2013. DNA barcoding detects contamination and substitution in North American herbal products. En: *BMC Medicine*, 11, 222. doi:<https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-222>
- Nikam, P., Kareparamban, J. y Jadhav, A., 2012. Future trends in standardization of herbal drugs. En: *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(6), pp.38-44
- Opara, L., 2003. Traceability in agriculture and food supply chain: a review of basic concepts, technological implications, and future prospects. En: *Food, Agriculture & Environment*, 1(1), pp.101-106.
- Persistence Market Research, 2017. *Global market study on botanical supplements: drugs application segment to hold maximum value share during 2017 - 2025* [En línea]. New York: Persistence Market Research. [Consulta: 3 de abril de 2020]. Disponible en: <https://www.persistencemarketresearch.com/market-research/botanical-supplements-market.asp>
- Ratnasingham, S. y Hebert, P., 2007. Bold: the barcode of life data system (<http://www.barcodinglife.org>). En: *Molecular Ecology Notes*, 7(3), pp.355-364. doi:0.1111/j.1471-8286.2007.01678.x
- Ratnasingham, S. y Hebert, P., 2011. BOLD's role in barcode data management and analysis: a response. En: *Molecular Ecology Notes*, (11), pp.941-942. doi:10.1111/j.1755-0998.2011.03067.x
- Schilter, B., Andersson, C., Anton, R., Constable, A., Kleiner, J., O'Brien, J., Renwick, A.G., Korver, O., Smith, F. y Walker, R., 2003. Guidance for the safety assessment of botanicals and botanical preparations for use in food and food supplements. En: *Food and Chemical Toxicology*, 41, pp.1625-1649. doi:10.1016/S0278-6915(03)00221-7
- Stallman, J., Funk, V., Price, J. y Knoppe, M., 2019. DNA barcodes fail to accurately differentiate species in Hawaiian plant lineages. En: *Botanical Journal of the Linnean Society*, (190), pp.374-388.
- Stoeckle, M., Gamble, C., Kirpekar, R., Young, G., Ahmed, S. y Little, D., 2011. Commercial teas highlight plant DNA barcode identification successes and obstacles. En: *Scientific Reports*, 1, 42. doi:<https://doi.org/10.1038/srep00042>
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Miquel, C., Valentini, A., Vermat, T., Corthier, G., Brochmann, Ch. y Willerslev, E., 2007. Power and limitations of the chloroplast trn L (UAA) intron for plant DNA barcoding. En: *Nucleic Acids Research*, 35(3), e14. doi:<https://doi.org/10.1093/nar/gkl938>

- Theodoridis, S., Stefanaki, A., Tezcan, M., Aki, C., Kokkini, S. y Vlachonasios, K., 2012. DNA barcoding in native plants of the Labiatae (Lamiaceae) family from Chios Island (Greece) and the adjacent Çeşme-Karaburun Peninsula (Turkey). En: *Molecular Ecology Resources*, 12(4), pp.620-633. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2012.03129.x>
- Vassou, S., Kusuma, G. y Parani, M., 2015. DNA barcoding for species identification from dried and powdered plant parts: A case study with authentication of the raw drug market samples of *Sida cordifolia*. En: *Gene*, (559), pp.86-93. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2015.01.025>
- Veldman, S., Jua, Y., Otienob, J., Abihudib, S., Posthouwerd, C., Gravendeeld, B., van Andeld, T.R. y de Boer, H., 2020. DNA barcoding augments conventional methods for identification of medicinal plant species traded at Tanzanian markets. En: *Journal of Ethnopharmacology*, 250, 112495. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112495>
- Vijayan, K. y Tsou, C., 2010. DNA barcoding in plants: taxonomy in a new perspective. En: *Current Science*, 99(11), pp.1530-1541.
- World Health Organization, 1999. *WHO monographs on selected medicinal plants*. Vol. 1. Ginebra: WHO.

Atropellos de mamíferos en la Región Este de Uruguay y su relación con los atributos del paisaje

Run-over of mammals in Uruguay's Eastern Region and its relationship with landscape attributes

Atropelamentos de mamíferos na região leste do Uruguai e sua relação com os atributos da paisagem

RECIBIDO: 19/4/2020 → APROBADO: 4/6/2020 ✉ agusserron@gmail.com

✉ SERRÓN, AGUSTINA(1) (2); COITIÑO, HUGO (2); SEGURA, ÁNGEL (1)

(1) MODELIZACIÓN Y ANÁLISIS DE RECURSOS NATURALES, CENTRO UNIVERSITARIO REGIONAL ESTE, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, ROCHA, URUGUAY

(2) ONG ECOBIO, URUGUAY

RESUMEN

Las carreteras constituyen una amenaza para la biodiversidad y causan impactos negativos como fragmentación de hábitats y atropellos. En el año 2015, la ONG ECOBIO Uruguay comenzó a trabajar en la temática con el fin de implementar medidas de mitigación. El objetivo de este trabajo fue describir y analizar los atropellos de medianos y grandes mamíferos en la Región Este de Uruguay y su relación con los atributos del paisaje. Partiendo de que la dinámica de los atropellos está influenciada en su mayoría por factores antrópicos, el tránsito es la variable explicativa más significativa. Se utilizaron algoritmos de aprendizaje automático (Random Forest) para modelar los atropellos de la región, caracterizada por la alta heterogeneidad de ecosistemas, la importante biodiversidad y varias áreas protegidas. Se analizaron 976 casos de atropellos, de 17 especies, que se distribuyeron de manera heterogénea. Los modelos para todas las especies presentaron una capacidad predictiva de más del 60% de acierto, y de un 80% para los modelos por especie. La ruta con mayor probabilidad de atropello fue la 9. Si bien las variables más importantes fueron similares en todos los modelos, las tres que los explicaron mejor fueron: el tránsito promedio diario anual, la distancia a caminos y la distancia a centros urbanos. Este trabajo es de los primeros estudios a nivel nacional que cuantifican formalmente el fenómeno, y sugiere que lo conveniente es analizar las especies por separado para evaluar posibles respuestas diferenciales que imposibiliten hallar patrones generales.

PALABRAS CLAVE: ecología de carreteras, impacto sobre fauna, modelización.

ABSTRACT

Roads constitute a threat to biodiversity, causing negative impacts such as fragmentation of habitats and run overs. In 2015, the NGO ECOBIO Uruguay began working on the subject in order to implement mitigation measures. The purpose of this research is to analyze medium and large-sized mammals' run over in Uruguay's Eastern region and its relationship with landscape attributes. Taking off the dynamic of run overs, this is frequently influenced by anthropic cases, traffic is the most prominent variable over this. Machine learning algorithms (Random Forest) and QGIS and R programs were used to model the run overs of the region, that is characterized by having heterogeneous ecosystems, important biodiversity and several protected areas. 976 cases of run overs were analyzed, from 17 species, that were distributed heterogeneously. The models analyzed by species had a predictive ability of 80% success, while when working with all species as a whole 60%. The route with the highest probability run overs was 'Route 9'. Although the most important variables were similar in all the models, the three that better illustrated the prediction models were: annual average daily traffic, the distance to backroads and distance to populated roads, this three illustrates better the predictions models. This work is one of the first studies at a national level which formally quantifies the phenomenon and suggests analyzing the species separately to evaluate possible differential responses that make it impossible to find general patterns.

KEY WORDS: ecology of roads, impact on fauna, modeling.

RESUMO

As rodovias são uma ameaça à biodiversidade, causando impacto negativo como fragmentação de habitats e atropelamentos. No ano 2015, a ONG ECOBIO Uruguai começou a trabalhar no tema a fim de implementar medidas de mitigação. O objetivo deste trabalho era descrever e analisar o atropelamento de mamíferos médios e grandes da região leste do uruguai e sua relação com os atributos da paisagem. Partindo de que a dinâmica dos atropelamentos é influenciada principalmente pelos fatores antrópicos, o tráfego é a variável explicativa mais significativa. Algoritmos de aprendizado automáticos foram utilizados (Random Forest) e os programas QGIS e R para modelar os atropelamentos da região, a qual é caracterizada por ter heterogeneidade de ecossistemas, a importante biodiversidade e várias áreas protegidas. 976 casos de atropelamentos foram analisados, de 17 espécies, que foram distribuídas heterogeneamente. Os modelos tinham uma capacidade preditiva de mais de 60% de previsões certas, e 80% para modelos por espécie. A rodoviária com mais probabilidade de atropelamento foi a 9. Sim bem as variáveis mais importantes foram semelhantes em todos os modelos, as três que os explicaram melhor foram: média tráfego diário anual, distância das estradas e distância dos centros urbanos, são as três que melhor explicaram os modelos. Este trabalho é dos primeiros estudos a nível nacional que quantificam formalmente o fenômeno, que sugere que o conveniente é analisar as espécies separadamente para avaliar possíveis respostas diferenciais que tornassem impossível encontrar padrões gerais

PALAVRAS-CHAVE: ecologia de estradas, impacto na fauna, modelage.

INTRODUCCIÓN

Las actividades humanas han causado una crisis ambiental a escala mundial, la cual tiene entre sus consecuencias más severas la pérdida de la biodiversidad (Ceballos, et al., 2010). La fragmentación o pérdida de hábitat, y la falta de conectividad son los impactos que generan mayor pérdida de biodiversidad (Torres, et al., 2003).

Una de las actividades antrópicas que genera fragmentación de hábitats es la construcción de carreteras y vías ferroviarias. Estas estructuras presentan diversos beneficios para los seres humanos: principalmente generan conexión entre las personas y las ciudades, permitiendo el movimiento de individuos y bienes (D'Amico, 2015). Los impactos generados por las carreteras pueden ser directos: atropellos, fragmentación y/o pérdida de hábitat, modificaciones en la capacidad de dispersión de plantas nativas o establecimiento de especies exóticas invasoras en los bordes de las carreteras. Y también pueden ser indirectos, como los cambios en la hidrología y la geomorfología (Puc-Sánchez, et al., 2013), entre otros. El atropello de fauna es el impacto directo más fácil de reconocer porque en las carreteras se observan los cuerpos de los animales atropellados (Torres, et al., 2003). El aumento de la mortalidad es la principal consecuencia del atropellamiento que afecta a las poblaciones de las especies involucradas, y es más relevante en aquellas que se encuentran amenazadas o son vulnerables. La importancia relativa del impacto depende del tamaño de la población y de la capacidad reproductiva de la especie (Taylor y Goldingay, 2004). Los mamíferos terrestres son los vertebrados más vulnerables al impacto de estas infraestructuras ya que presentan una baja densidad poblacional y/o tienen un área de acción muy amplia, lo cual lleva a que deban desplazarse a grandes distancias, aumentando la probabilidad de ser afectados en las carreteras (Barri, 2010). Estos efectos están subestimados, pues en algunos casos se dificulta reconocer la especie atropellada (Torres, et al., 2003). Los estudios de los impactos de las carreteras sobre la biodiversidad se llevan a cabo desde hace varias décadas en el hemisferio norte (Cupul, 2002; Grilo, et al., 2009; Arroyave, et al., 2006). De estos trabajos surge que el índice de atropellamiento y su frecuencia están relacionados con diversos factores, tales como el flujo vehicular, la velocidad, la anchura de la vía, el comportamiento de las especies y la cobertura vegetal. Esto ha permitido un avance importante en la temática y en la generación de estrategias de mitigación (Seiler, et al., 2006; Ford y Fahrig, 2007; Grilo, et al., 2009; Bowman, et al., 2010; D'Amico, 2015). En las últimas décadas, la cantidad de estudios sobre los impactos de las carreteras ha aumentado considerablemente, lo que lleva al surgimiento de una disciplina llamada Ecología de Rutas (D'Amico, 2015). Se ha demostrado que los patrones paisajísticos deben ser considerados a la hora de evaluar la distribución espacial de los atropellos, puesto que permiten identificar ambientes o zonas con elevadas tasas de siniestralidad. Diversos grupos faunísticos se encuentran ligados con cierta especificidad a determinados ecosistemas o usos de suelo adyacentes (Colino, 2011). La caracterización de patrones paisajísticos espaciales utilizando variables agrupadas es un método eficaz y se utiliza de forma rutinaria en trabajos de distribución de especies (Benito 2007; Mateo, 2011). Este método está poco explorado en cuanto a la modelización de atropellos

de mamíferos. Analizar las variables que determinan la prevalencia de atropellos en ruta se torna crucial para analizar la dinámica de las especies vulnerables, y plantear eficientes medidas de gestión y mitigación (Colino, 2011). Es necesaria la utilización de métodos basados en técnicas de modelización que sean eficaces para el entendimiento del impacto de las infraestructuras (Colino, 2011). Es importante para una correcta mitigación conocer cuáles son las zonas vulnerables en las rutas, que se definen como aquellas que tienen mayor probabilidad de que ocurra un atropello (Carvajal-Alfaro, 2010).

Los métodos estadísticos lineales, como los modelos lineales generalizados (GLM), pueden ser inadecuados para describir estos patrones y relaciones ya que generalmente no cumplen los supuestos entre los patrones y las relaciones que imponen los GLM. Es por esto que en general no se pueden expresar mediante ecuaciones lineales simples. En este sentido, algoritmos que no presentan estos supuestos restrictivos y pueden capturar la fuerte no linealidad de los datos aparecen como una opción útil (De'ath, et al., 2000). En los últimos años, los ecólogos han utilizado ampliamente los árboles de clasificación y los bosques aleatorios (Random Forest) debido a su interpretación simple y su capacidad para caracterizar interacciones complejas (Breiman, et al., 1984; Hastie, et al., 2001; Prasad, et al., 2006). Random Forest ha sido ampliamente utilizado en campos tan diversos como la teledetección (Guhimre, et al., 2010), la genética (Cutler y Stevens, 2006), la ecología (Cutler, et al., 2007), la edafología (Schmidt, et al., 2008) y la hidrogeología (Baudron, et al., 2013). Estos modelos permiten describir y predecir los atropellos en zonas donde no se han realizado relevamientos. En la actualidad existen pocos trabajos de modelización de atropellos, más aún en Uruguay, donde la temática es incipiente (Ascensão, et al., 2019; Malo, et al., 2004).

El objetivo de este trabajo es describir y analizar la dinámica a nivel espacial de atropellos de medianos y grandes mamíferos en la Región Este, y modelar explícitamente su relación con los atributos del paisaje.

MATERIALES Y MÉTODOS

La Región Este de Uruguay comprende los departamentos de Rocha, Canelones, Maldonado, Treinta y Tres, Lavalleja y Cerro Largo, y se caracteriza por presentar una gran heterogeneidad de ecosistemas y una alta biodiversidad de vertebrados (DINAMA, 2018). Además, se encuentran allí varias de las Áreas Protegidas del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP; Figura 1).

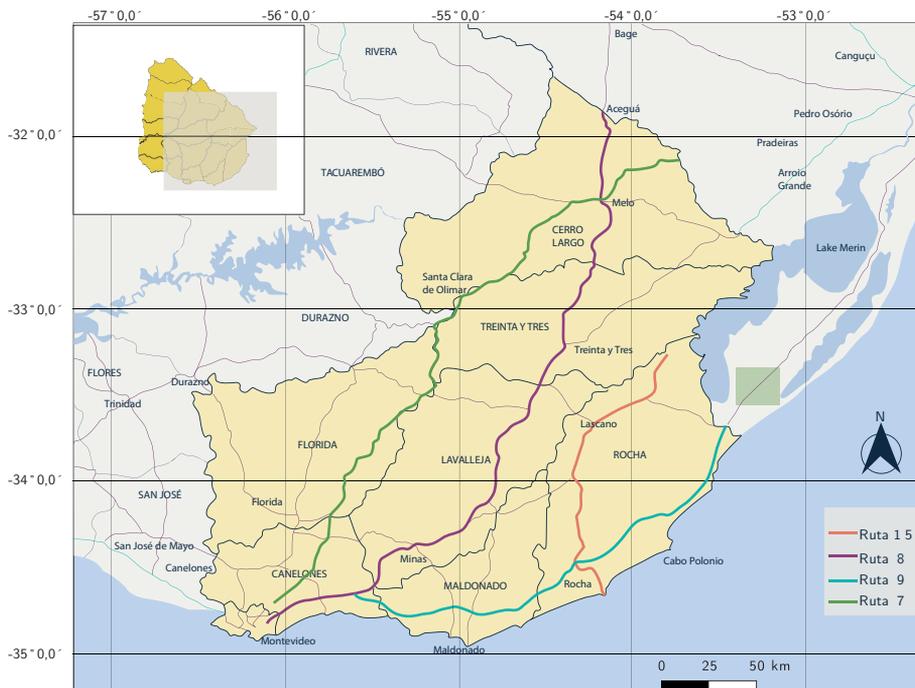


Figura 1. Mapa del área de estudio, se muestran representadas las rutas elegidas.

Los datos utilizados pertenecen a los registros de mamíferos atropellados en las rutas 7, 8, 9 y 15, realizados por la ONG ECOBIO Uruguay en la línea de investigación *Ecología de carreteras y biodiversidad*, ejecutada entre 2015 y 2016 (Coitiño, et al., 2018). Estas rutas presentan características diferentes: las rutas 8 y 9 son corredores internacionales que conectan Brasil con Uruguay, además de atravesar varias localidades turísticas, lo que genera un alto tránsito. Por otro lado, las rutas 7 y 15 conectan localidades internas del país, teniendo menor tránsito. Se utilizó el relevamiento del año 2015, que se compone de 976 registros georreferenciados de 17 especies de mamíferos en 4 rutas de la Región Este, que abarcan 1295 kilómetros. Se utilizó el programa de código abierto y libre R (R-Core Team, 2019) para realizar análisis exploratorios de las variables (histograma de la abundancia de atropellos por cuadrícula, relaciones entre variables, dependencia entre variables) y modelos de predicción con el algoritmo Random Forest (Breiman, 2001), utilizando el paquete Random Forest desarrollado por Liaw y Winer en 2002.

Las matrices con las variables explicativas de temperatura, precipitación, evapotranspiración, radiación, humedad, pendiente, altura, características de suelo, usos de suelo, distancias (distancia a caminos, distancia a rutas, distancia a centros urbanos, distancia a ríos, distancia a costa), y urbanización fueron cedidas por el Laboratorio de Desarrollo Sustentable y Gestión Ambiental del Territorio (LDGT-Facultad de Ciencias, Universidad de la República) con una agregación espacial en mallas cuadradas de 1 km². Además, se agregó una variable con el número de ruta a partir de una capa vectorial de caminería, y se utilizó una variable de tránsito promedio diario anual, con datos obtenidos del Ministerio de Transporte y Obras Públicas (MTOP).

Cada variable fue asignada a una de tres categorías: i) climática, ii) antrópica y iii) geográfica (Tabla 1). La variable a explicar es binaria, de presencia o ausencia de atropello de un grupo o especie por cuadrícula. Se extrajeron los valores de las variables explicativas para cada registro, con el programa QGIS.

Tabla 1. Variables utilizadas para los modelos, agrupadas en los factores: climático, geográfico y antrópico. Elaboradas por el Laboratorio de Desarrollo Sustentable y Gestión Ambiental del Territorio (LDGT-Facultad de Ciencias, Universidad de la República).

Factor	Código	Variable
Climático	B1	Temperatura media anual
	B2	Intervalo diurno promedio (temperatura media mensual -temperatura máx. mín.)
	B3	Isoterma (BIO2 / BIO7) (* 100)
	B4	Temperatura estacional (desviación estándar * 100)
	B5	Temperatura máxima del mes más cálido
	B6	Temperatura mínima del mes más frío
	B7	Temperatura rango anual (BIO5-BIO6)
	B8	Temperatura media del trimestre más húmedo
	B9	Temperatura media del trimestre más seco
	B10	Temperatura media del trimestre más cálido
	B11	Temperatura media del trimestre más frío
	B12	Precipitación anual
	B13	Precipitación del mes más húmedo
	B14	Precipitación del mes más seco
	B15	Precipitación estacional (coeficiente de variación)
	B16	Precipitación del trimestre más húmedo
	B17	Precipitación del trimestre más seco
	B18	Precipitación del trimestre más cálido
	B19	Precipitación del trimestre más frío
	PMAX_MED	
RAD		Radiación solar global media (en base a los 12 puntos de estimativos, basados en climatología de largo plazo del MSU v1.0, se elabora la distribución espacial aproximada sobre todo el territorio uruguayo del promedio mensual de los acumulados diarios de energía solar por metro cuadrado en plano horizontal a nivel de suelo)
ETP		Evapotranspiración potencial
ETR		Evapotranspiración real
HAN		Humedad media anual
HTC		Humedad del trimestre más cálido (enero, febrero, marzo)
HTF		Humedad del trimestre más frío (julio, agosto, setiembre)
HEL		Helada media
BH_VER		Balance hídrico en verano
BN_OTO		Balance hídrico en otoño
BH_INV		Balance hídrico en invierno
BH_PRIM		Balance hídrico en primavera
BH_AN		Balance hídrico medio anual
Geográfico	ESC	Escabrosidad, diferencia de alturas
	PEND	Pendiente en porcentaje

OR	Orientación sur o norte (está en ángulos -0 es el norte- y varía en sentido horario)
DR	Distancia a ríos
DCO	Distancia a la costa
NDVI	Índice de vegetación de diferencia normalizada
PS	Profundidad del suelo
TS	Textura del suelo
RS	Rocosisidad del suelo
IS	Inundabilidad del suelo
BOSQ	Porcentaje de superficie ocupada por bosque
HUMED	Porcentaje de superficie ocupada por humedal
CN	Porcentaje de superficie ocupada por campo natural
FOREST	Porcentaje de superficie ocupada por forestación
AGR	Porcentaje de superficie ocupada para agricultura y campo artificial
URB	Porcentaje de superficie urbanizada
DU	Distancia a zona urbanizada (distancia del píxel a la localidad urbana más próxima medida en km. La planta urbana tiene delimitación real)
Antrópico	
DR	Distancia a rutas (distancia del píxel a la ruta nacional o departamental más próxima medida en km. Cuando la ruta pasa por el píxel el valor es 0. Cobertura de rutas de las cartas topográficas 1.50.000 digitalizadas)
DC	Distancia a caminos (camino departamental o rural más próximo medidos en km. Cuando la ruta pasa por el píxel el valor es 0. Cobertura de rutas de las cartas topográficas 1.50.000 digitalizadas)
DNP	Densidad poblacional
CM	Camino en metros (cantidad de metros lineales de caminos y/o rutas que están dentro del píxel expresados en metros. Cobertura de rutas de las cartas topográficas 1.50.000 digitalizadas)
LAT	Latitud
LONG	Longitud
DP	Distancia entre los registros
TPDA	Tránsito promedio diario anual

El modelo utilizado fue el de bosques aleatorios (Random Forest). Este es un algoritmo predictivo que usa la técnica de *bagging* para combinar diferentes árboles de clasificación individuales. Para generar los árboles se realiza una serie de divisiones binarias de los datos en subconjuntos los más homogéneos posibles, según diversas reglas de decisión, hasta llegar a un árbol maximal donde se reparten todas las observaciones que contiene en cada nodo terminal con una muy poca cantidad de datos (Bourel, 2012). Cada árbol es construido con observaciones remuestreadas con reposición del conjunto de datos original, y en cada rama del árbol las variables seleccionadas para realizar el corte son seleccionadas de forma aleatoria (Breiman, 2001; Cutler, et al., 2007; Segura, et al., 2017). En el caso de un problema de clasificación, la predicción de una observación hecha por Random Forest es la clase más votada entre las predicciones hechas por los diferentes árboles y en regresión se hace un promedio de los valores asignados (Bourel, et al., 2018). La salida generada por el modelo es la probabilidad de que ocurra un atropello o más para cada una de las cuadrículas.

Para analizar el desempeño general del modelo se utilizaron las matrices de confusión que construye el algoritmo Random Forest basadas en los datos, evaluando la capacidad predictiva del modelo en observaciones que no fueron sorteadas

en el remuestreo (en inglés OOB, *out of bag*; Breiman, 2001). Estas representan una estimación honesta de la performance del modelo, pues no son datos utilizados para entrenar el modelo y no corren el riesgo de sobreajuste. Además de la precisión general se evaluó la precisión de cada clase, ya que en casos desbalanceados provee de una evaluación más útil (Segura, et al., 2017).

Tabla 2. Proporciones de los datos, para el modelo global y para cada una de las rutas con más registros (7, 8, 9, 15). Cantidad total de celdas utilizadas en el modelo y proporción de celdas con atropello.

	Global	R7	R8	R9	R15
Cantidad de celdas totales	1546	477	506	336	227
Cantidad con atropello	37%	15%	48%	52%	34%

En los casos en que la proporción de clases estuvo desbalanceada, es decir cuando una clase de la variable respuesta se presentó en proporciones muy inferiores a la otra (Pino, 2017), el error de clasificación conllevó bajas tasas de acierto sobre las clases minoritarias (Chen, et al., 2004). Dentro de las estrategias más utilizadas están las relacionadas a la selección de los datos, como muestreo en la clase mayoritaria (*Down-sampling*), en la cual se hace una selección aleatoria de n casos entre los N de la clase mayoritaria, o remuestreo en la clase minoritaria (*Upsampling*), en donde se toma una muestra aleatoria con reemplazamiento de tamaño N (lo que se conoce como muestra *bootstrap*) extraída del conjunto de los n casos de la clase minoritaria (Pino, 2017). Aun así, en muchos casos, estas estrategias no solucionan el problema ya que dan como resultado datos duplicados, haciendo que las variables presenten una varianza menor a la real. Otra estrategia consiste en utilizar umbrales de decisión alternativos. Las reglas de clasificación binaria como las que proporciona Random Forest se pueden definir mediante una expresión donde se compara la probabilidad estimada de pertenecer a la clase de interés con un punto de corte (pc), que suele ser 0.5. Se pueden utilizar otros puntos de corte que conduzcan a mayores valores para el acierto en la clase minoritaria (en general este acierto es la sensibilidad) (Pino, 2017). En estos casos se probaron técnicas de remuestreo y cambio de umbrales de decisión para evaluar el efecto del desbalance sobre el poder de clasificación.

Por otro lado, el método Random Forest permite una estimación de la importancia relativa de cada variable. La importancia media en pureza que aporta una determinada variable será medida mediante el índice de Ginni. La importancia se construye en base a permutar las variables y evaluar su aporte a la disminución de la impureza de las particiones con respecto a la variable original. Por ejemplo, permutar una variable importante hará que la misma no aporte a disminuir la impureza de los nodos hijos comparado con la variable original; mientras que una variable poco importante no mostrará grandes diferencias en su capacidad relativa para disminuir la impureza cuando es permutada (Hastie, et al., 2001).

Por último, se seleccionaron las especies que contaban con más registros de atropello, como el zorrillo (*Conepatus chinga*), con 354 registros, y el zorro de campo (*Lycalopex*

gymnocercus), con 159 registros. La variable de respuesta utilizada fue categórica con dos clases (1 atropello y 0 no atropello). Las variables explicativas fueron las utilizadas en los modelos generales.

RESULTADOS

La cantidad total de registros de atropellos fue de 976 individuos en el año 2015. En cuanto a la cantidad de individuos de una misma especie atropellados, el zorrillo presentó 354 registros, el zorro de campo, 159; mientras que el zorro de monte (*Cerdocyon thous*), 148 registros. Dentro de la lista de especies protegidas del Sistema de Áreas Protegidas (SNAP) en Uruguay, encontramos el margay (*Leopardus wiedii*), que se mostró como el más afectado, con 17 individuos atropellados; y en el otro extremo, el coati (*Nasua nasua*), con un solo registro.

Tabla 3. Registros de atropello por especie de mamíferos y estado de conservación según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). Preocupación menor (LC), Datos insuficientes (DD), Casi amenazada (NT), Vulnerable (VU).

Especie	Estado de conservación UICN	Registros de atropello
<i>Conepatus chinga</i> (zorrillo)	Sin riesgo	354
<i>Lycalopex gymnocercus</i> (zorro de campo)	LC	159
<i>Cerdocyon thous</i> (zorro de monte)	LC	148
<i>Didelphis albiventris</i> (comadreja mora)	Sin riesgo	127
<i>Lontra longicaudis</i> (lobito de río)	DD	65
<i>Dasyurus hybridus</i> (mulita)	NT	56
<i>Leopardus geoffroyi</i> (gato montés)	NT	45
<i>Dasyurus novemcinctus</i> (tatú)	LC	39
<i>Lepus europaeus</i> (liebre)	Sin riesgo	30
<i>Galictis cuja</i> (hurón)	Sin riesgo	21
<i>Leopardus wiedii</i> (margay)	VU	17
<i>Mazama gouazoubira</i> (guazubirá)	Sin riesgo	4
<i>Myocastor coypus</i> (nutria)	LC	3
<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> (carpincho)	LC	1
<i>Nasua nasua</i> (coati)	LC	1

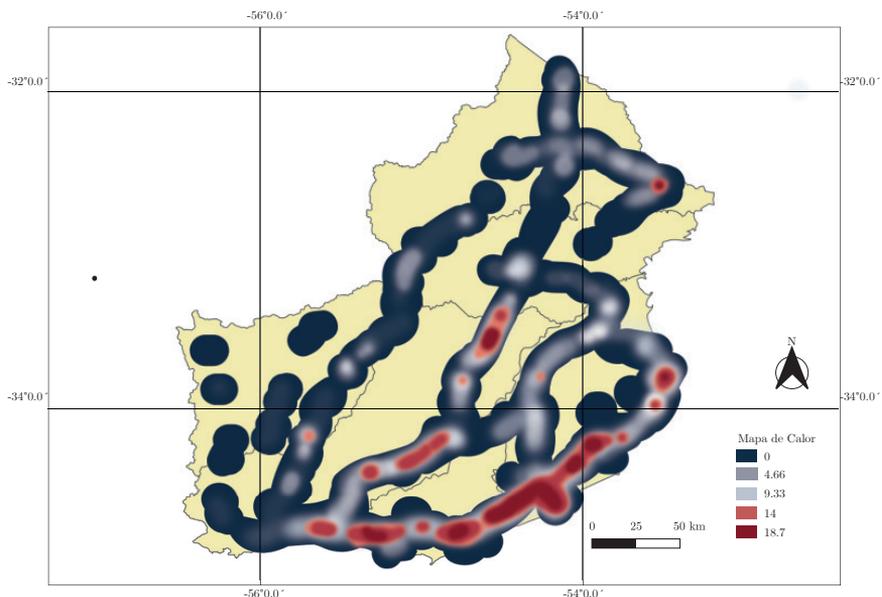


Figura 2. Mapa de calor de los datos de atropello en la Región Este del país. En color rojo se muestran las zonas con mayor densidad de puntos.

En cuanto a la distribución de los atropellos en la zona de estudio, se puede observar que las áreas con mayor densidad de registros corresponden a la ruta 9 (341 registros) y la ruta 8 (299 registros). En tanto, la ruta 7 es la que presenta menor densidad de atropellos (Figura 2).

El porcentaje de aciertos para el modelo fue superior al 60% en los datos OOB. El modelo global que incluye todas las rutas tuvo un 68,89% de acierto, similar al de los modelos creados para cada ruta, a excepción de la ruta 7, la cual tuvo un porcentaje del 82,6%. Las predicciones de la clase mayoritaria presentan un mejor desempeño respecto a la clase minoritaria (atropellos).

Tabla 4. Resultados del Random Forest de clasificación del modelo global, y por rutas (se promediaron 500 árboles). El porcentaje de acierto es calculado como 1 menos el error OOB, los errores de clase fueron tomados de la matriz de confusión de cada modelo. Las variables se encuentran ordenadas de mayor a menor importancia. DU = Distancia a centros urbanos, DC = Distancia a los caminos, NDVI = Índice de vegetación de diferencia normalizada, ALT = Altura en metros sobre el nivel del mar, HAN = Humedad media anual, CN = Porcentaje de superficie ocupada por campo natural. La corrección de los modelos fue modificar el umbral para la clase minoritaria de 0.5 a 0.7 (Corrección Ruta 7 y Ruta 15).

Ruta	Global	Ruta 7	Correción R7	Ruta 8	Ruta 9	Ruta 15	Correción R15	Zorrillo	Zorro de campo
Matriz de Confusión									
Acierto de Clase									
Atropello	53%	3%	33%	62%	26%	22%	56%	18%	7%
No atropello	78%	98%	68%	59%	80%	82%	54%	99,5%	99,8%
Variables									
1	DC	DC	DC	DC	DU	DC	DC	DU	DC
2	DU	ALT	NDVI	CN	DC	CN	CN	DC	NDVI
3	HAN	DU	DU	HAN	NDVI	NDVI	DU	NDVI	ALT

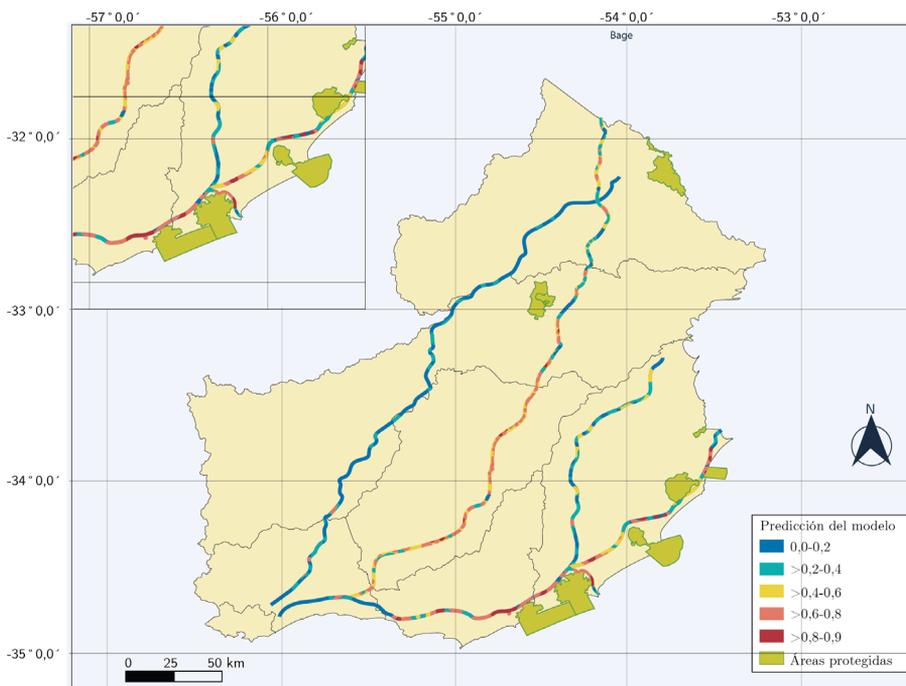


Figura 3. Mapa con el resultado de la predicción del modelo realizado con la variable de respuesta 0 para no atropello y 1 para atropello, para cada celda. Color rojo muestra mayor probabilidad de atropello; color celeste, menor probabilidad de atropello.

Respecto a la importancia de las variables, se observa que para los cinco modelos y para las correcciones del modelo de las rutas 7 y 15 los resultados obtenidos son similares (Tabla 4). Las dos variables más importantes fueron la distancia a caminos (DC) y la distancia a centros urbanos (DU), las cuales corresponden al factor antrópico. Luego le siguen en importancia la altitud (ALT) (geográfica) y el índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI) (climática), variables que se encuentran en todos los modelos (Tabla 3).

Como las variables fueron similares, se generó un gráfico de importancia de variables para el modelo global (Figura 4), en donde se observan las 11 variables más importantes. En las primeras posiciones se muestran DC y DU, mientras que el tránsito promedio diario anual se encuentra en la posición 11 (Figura 4).

La relación del número de atropellos con la distancia a centros urbanos presenta un patrón jorobado, donde la abundancia de organismos atropellados aumenta progresivamente hasta llegar a un máximo de 10 km y luego decrece a distancias mayores.

El porcentaje de acierto de los modelos por especie fue superior al 80%, teniendo una mayor precisión para el zorro de campo. Las predicciones tienen un mayor error para la clase de atropello, al igual que en las otras modelizaciones.

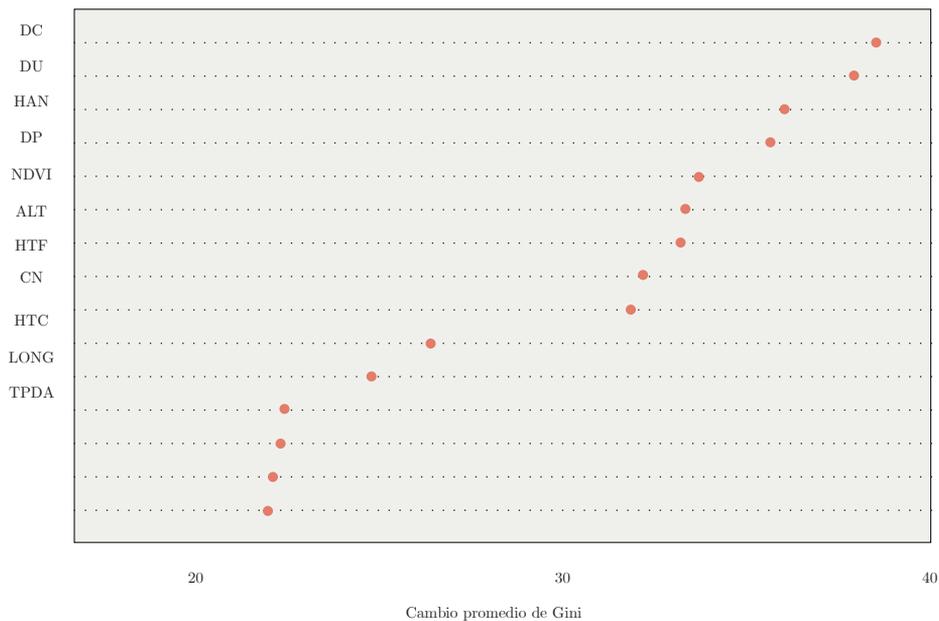


Figura 4. Importancia de las variables para el modelo, en orden de mayor a menor según el Índice de Gini. DC = Distancia a los caminos, HTF = Humedad del trimestre más frío (julio, agosto, setiembre), NDVI = Índice de vegetación de diferencia normalizada, ALT = Altura en metros sobre el nivel del mar, HAN = Humedad media anual, CN = Porcentaje de superficie ocupada por campo natural, HTC = Humedad del trimestre más cálido (enero, febrero, marzo), LONG = Longitud, TPDA = Tránsito promedio diario anual, DU = Distancia a centros urbanos, DP = Distancia entre los registros.

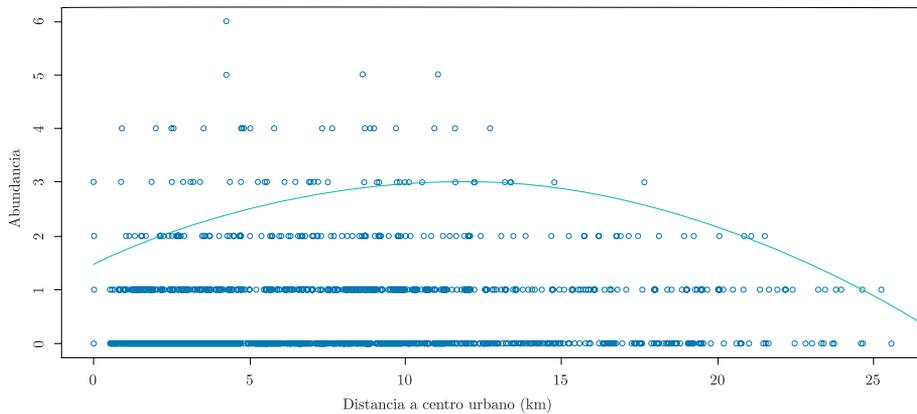


Figura 5. Relación de la abundancia de organismos atropellados con la variable distancia a centros urbanos. Cada punto corresponde a una cuadrícula de 1km².

Se observa que para la variable distancia a centros urbanos, la relación se ajusta a una parábola positiva con un máximo a los 10 km del centro urbano. Cerca de los centros urbanos la abundancia de atropellos es baja; al alejarse de estos, se llega a un punto donde se registra un máximo de atropellos. Luego de ese pico, la abundancia comienza a disminuir nuevamente. Es decir, para una distancia determinada a los centros urbanos es donde se llega a la mayor abundancia de atropellos por cuadrícula, entre 3 y 4. Por otro lado, las mayores densidades de puntos son de celdas con 0,1 y 2 atropellos, y se encuentran cerca de los centros urbanos (Figura 5).

DISCUSIÓN

El presente trabajo resume información sobre los atropellos en rutas del este de Uruguay, y propone un abordaje de modelización mediante aprendizaje automático para predecir la ubicación de los atropellos e identificar variables asociadas. Las rutas tienen un efecto relevante para la biodiversidad de mamíferos medianos y grandes en el país (Cáceres, et al., 2008), generando impactos sobre diversos órdenes taxonómicos, tamaños corporales y especies con diferente estado de conservación. Es necesario mejorar la capacidad predictiva de los modelos para poder utilizarlos en la generación de medidas que minimicen el problema del atropello de fauna silvestre.

Entre las especies atropelladas se hallan algunas prioritarias para la conservación, como el margay, con una población muy pequeña (González, 2013), y el coatí. En especies de mamíferos cuyas poblaciones se encuentran muy reducidas, existe evidencia que señala que reducir los factores de riesgo de mortalidad producidos por causas antrópicas, como el caso de atropellos en rutas, es tan o más importante que la restauración del hábitat a modo de mantener la viabilidad poblacional. (Ferrerías, et al., 2001; Kerley, et al., 2002).

De las 15 especies atropelladas, 9 son carnívoras (gato montés, margay, lobito de río, hurón, zorrillo, coatí, mano pelada, zorro de campo y zorro de monte). Esto es similar a lo que evidencian otros trabajos, donde los ungulados y los carnívoros son

los más afectados por las carreteras (Delgado-Vélez, 2014). Por otro lado, la mayoría de estas especies tienen hábitos nocturnos y necesitan grandes extensiones de territorio para sobrevivir (Artavia, et al., 2015), lo que dificulta su identificación para los conductores y aumenta el riesgo de colisión.

Las especies más afectadas en número de atropellos son el zorrillo y los zorros, lo que puede deberse a la gran abundancia de estas especies en Uruguay (González, 2001). Los resultados de las especies afectadas por el atropello en las carreteras confirman que las colisiones de vehículos con animales silvestres son un problema grave que justifica la aplicación generalizada de medidas de mitigación (Malo, et al., 2004).

Las 10 variables más importantes relacionadas con el número de atropellos fueron antrópicas. En la mayoría de los modelos, la más importante fue la distancia a los caminos, una variable que describe la distancia de la cuadrícula al camino departamental más próximo medido en km. Cuando la ruta pasa por la cuadrícula el valor es 0. Esto podría explicarse porque, generalmente, cerca de las rutas principales existen caminos secundarios que conectan las carreteras con los centros urbanos cercanos, lo que aumenta el flujo vehicular local. La segunda variable más importante es la distancia a centros urbanos, que está relacionada con el flujo vehicular de la zona y que no es capturado por métricas más generales de tráfico registradas en los peajes (e.g. TPDA). Por lo tanto, hay un gran flujo de vehículos que no está siendo tomado en cuenta por la variable TPDA, lo que puede explicar su baja contribución a la predicción de atropellos. Los modelos mostraron que existe una distancia óptima en la cual aumenta la probabilidad de registrar un atropello (10 km). Esto puede deberse a un mayor flujo de vehículos, aunque también es esperable que la fauna de mamíferos se encuentre empobrecida cerca de los grandes centros urbanos (Santos y Tabarelli, 2002). Es por esto que hay una alta probabilidad de atropellos en una zona intermedia, ya que hay más cantidad de mamíferos y aún sigue habiendo gran cantidad de tránsito. Las variables de distancia a caminos y a centros urbanos podrían ser una medida indirecta de tránsito alrededor de los centros urbanos, es decir de cortas distancias y que resulta importante explorar para comprender los mecanismos que favorecen el atropello de mamíferos.

Los resultados encontrados en este trabajo son similares a los de Ascensão y colaboradores (2019), donde a partir de modelos lineales generalizados (GLM) antrópicas. Después de estas, según cada especie, se encuentran la cobertura vegetal, temperatura o el NDVI (Ascensão, et al., 2019).

El porcentaje de acierto de los modelos para el zorrillo y el zorro de campo fue superior al 80%, obteniendo una mejora en las predicciones respecto a los modelos que se realizaron para predecir los atropellos en todas las especies agrupadas. Esto sugiere que los modelos por especies y no por rutas son los más adecuados ya que es esperable que los organismos de una misma especie se presenten en hábitats similares y, por lo tanto, se reduce la variabilidad y aumenta la capacidad de predicción. Las variables más importantes para estas especies también fueron de índole antrópica, por ejemplo, para el zorrillo, la más importante fue la distancia a los centros urbanos, y para el zorro, la distancia a caminos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo aportan una caracterización de los atropellos en las principales carreteras de la Región Este del país, lo que

permitirá avanzar en la implementación de medidas de mitigación para disminuir la mortalidad por atropellos en dicha región. Estas medidas podrían ser la colocación de cartelería, la cual a fines del año 2019 se llevó a cabo ubicando carteles de disminución de velocidad para vehículos en tramos de las rutas 9 y 15. Por otro lado, se pretende colocar vallas que corten el paso de animales hacia la ruta en zonas donde se encuentren puentes de agua, para lograr que los animales crucen por debajo. Estas medidas están dentro de las más económicas, pero a nivel mundial se reconoce que los pasos de fauna, es decir los puentes subterráneos o aéreos, son los más efectivos (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2006; Aizpurúa, 2010). Conocer dónde se encuentran las zonas con mayores efectos de las rutas sobre la fauna silvestre y cuáles son las especies más afectadas permitirá definir prioridades sobre las especies y las medidas adecuadas para su conservación (Ascensão, et al., 2019). Sin embargo, es importante continuar con estos trabajos mejorando algunos aspectos, como generar variables con una mayor resolución espacial que permitan identificar los sitios de alta probabilidad de atropello con más precisión. También sería importante elaborar variables explicativas que describan mejor las características de las carreteras como, por ejemplo, la vegetación de los bordes, la anchura y el tipo de pavimentación, entre otras. Esto permitirá mejorar los modelos predictivos y comprender cómo las características del paisaje afectan a las poblaciones de mamíferos en Uruguay.

Por último, de este trabajo surgen nuevas hipótesis o preguntas, como evaluar si hay una variación estacional en la cantidad de atropellos en todas las rutas, ya que en primavera-verano están en época reproductiva; mientras que en invierno los animales se desplazan en menores distancias. Además, es necesario evaluar características específicas de cada ruta, como por ejemplo si en la ruta 9 existe una variación temporal ocasionada por el aumento del turismo, generando mayor atropello cerca de las zonas más turísticas. Asociado a esto, el aumento de atropello en época de turismo se puede deber a un mayor desplazamiento de especies de mamíferos debido a una mayor circulación de personas. Se pretende en futuros trabajos analizar estos aspectos para tener un mayor entendimiento de la distribución de los atropellos en esta región, y así poder lograr mejores medidas de mitigación contra este problema.

REFERENCIAS

- Aizpurúa, N., 2010. *Medidas preventivas, correctoras y compensatorias del impacto ecológico de carreteras*. Madrid: Universidad Politécnica de Madrid. (Tesis de Doctorado).
- Arroyave, M.D.P., Gómez, C., Gutiérrez, M.E., Múnera, D.P., Zapata, P.A., Vergara, I.C. y Ramos, K.C., 2006. Impactos de las carreteras sobre la fauna silvestre y sus principales medidas de manejo. En: *Revista EIA*, (5), pp.45-57.
- Artavia, A., Jiménez, M., Martínez-Salinas, A., Pomareda, E., Araya-Gamboa, D. y Arévalo-Huezo, E., 2015. Registro de mamíferos silvestres en la sección de la ampliación de la Ruta 32, Limón, Costa Rica. En: *Brenesia*, 83-84, pp.37-46.

- Ascensão, F., Yogui, D., Alves, M., Medici, E.P. y Desbiez, A., 2019. Predicting spatiotemporal patterns of road mortality for medium-large mammals. En: *Journal of Environmental Management*, 248, 109320. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109320>
- Barri, F., 2010. Evaluación preliminar de la mortandad de mastofauna nativa por colisión con vehículos en tres rutas de Argentina. En: *Ecología Aplicada*, 9(2), pp.161-165.
- Baudron, P., Alonso-Sarría, F., García-Aróstegui, J., Cánovas-García, F., Martínez-Vicente, D. y Moreno Brotóns, J., 2013. Identifying the origin of groundwater samples in a multi-layer aquifer system with Random Forest classification. En: *Journal of Hydrology*, 499, pp.303-315.
- Benito, B. y Peñas, J., 2007. Aplicación de modelos de distribución de especies a la conservación de la biodiversidad en el sureste de la Península Ibérica. En: *GeoFocus. Revista Internacional de Ciencia y Tecnología de la Información Geográfica*, (7), pp.100-119.
- Bowman, J., Ray, J.C., Magoun, A.J., Johnson, D.S. y Dawson, F.N., 2010. Roads, logging, and the large-mammal community of an eastern Canadian boreal forest. En: *Canadian Journal of Zoology*, 88(5), pp.454-467.
- Breiman, L., Friedman, J., Stone, Ch. y Olshen, R.A., 1984. *Classification and regression trees*, wadsworth. Oxford: Taylor & Francis.
- Breiman, L., 2001. Random forests. En: *Machine Learning*, 45(1), pp.5-32.
- Bourel, M., 2012. Métodos de agregación de modelos y aplicaciones. En: *Ingeniería*, 10, pp.19-32.
- Bourel, M. y Segura, A.M., 2018. Multiclass classification methods in ecology. En: *Ecological Indicators*, 85, pp.1012-1021. <https://doi.org/10.1016/j.ecoind.2017.11.031>
- Cáceres, N., Wideberg, J.P. y Benitez, F.G., 2008. Review of traffic data estimations extracted from cellular networks. En: *IET Intelligent Transport Systems*, 2(3), pp.179-192.
- Carvajal-Alfaro, V., Díaz-Quesada, F. y Gallardo-Loría, R., 2010. *Estrategias para la conservación de poblaciones de mamíferos silvestres en rutas turísticas de acceso al cantón de Sarapiquí* [En línea]. San Carlos: Instituto Tecnológico de Costa Rica. [Consulta: 20 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/6281>

- Ceballos, G., García, A., y Ehrlich, P.R., 2010. The sixth extinction crisis loss of animal populations and species. En: *Journal of Cosmology*, 8, pp.1821–1831.
- Chen, C., Liaw, A., y Breiman, L., 2004. *Using random forest to learn imbalanced data* [En línea]. Berkeley: University of California. [Consulta: 12 de octubre de 2019]. Disponible en: <https://statistics.berkeley.edu/sites/default/files/tech-reports/666.pdf>
- Coitiño, H., Montenegro, F. y Guerrero, J.C., 2018. Uruguay y el impacto de las carreteras: contexto y perspectivas a futuro. En: Bager, A. *Infraestructura viaria & biodiversidade: métodos e diagnósticos*. Lavras: UFLA. pp 244-269.
- Colino, V., 2011. *Contribuciones al análisis de mortalidad de vertebrados en carreteras*. Salamanca: Facultad de Ciencias Agrarias y Ambientales. (Tesis Doctoral).
- Cupul, F., 2002. Víctimas de la carretera: fauna apachurrada. En: *Gaceta CUC. Departamento de Ciencias. Centro Universitario de la Costa, México*.
- Cutler, A. y Stevens, J.R., 2006. Random forests for microarrays. En: *Methods in Enzymology*, 411, pp.422-432.
- 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.
- Delgado-Vélez, C.A., 2014. Adiciones al atropellamiento vehicular de mamíferos en la vía de El Escobero, Envigado (Antioquia), Colombia. En: *Revista EIA*, 11(22), pp.147-153.
- DINAMA, OSE, DINARA, IDR y CURE, 2018. *Estado ambiental de las lagunas costeras de Rocha y Castillos y de sus principales tributarios*. Montevideo: DINAMA, OSE, DINARA, IDR y CURE.
- De'ath, G. y Fabricius, K.E., 2000. Classification and regression trees: a powerful yet simple technique for ecological data analysis. En: *Ecology*, 81, pp.3178–3192.
- D'Amico, M., 2015. *One the road: los distintos impactos del tráfico motorizado sobre poblaciones de animales*. Sevilla: Universidad Pablo de Olavide. (Tesis Doctoral).
- Ferreras, P., Gaona, P., Palomares, F. y Delibes, M., 2001. Restore habitat or reduce mortality? Implications from a population viability analysis of the Iberian lynx. En: *Animal Conservation Forum*, 4(3), pp.265-274. DOI: 10.1017/S1367943001001317

- Ford, A.T. y Fahrig, L., 2007. Diet and body size of North American mammal road mortalities. En: *Transportation Research Part D: Transport and Environment*, 12(7), pp.498-505.
- González, E.M., 2001. *Guía de campo de los mamíferos de Uruguay: introducción al estudio de los mamíferos*. Montevideo: Vida Silvestre.
- González, E.M., Martínez-Lanfranco, J.A., Juri, E., Rodales, A.L., Botto, G. y Soutullo, Á., 2013. Mamíferos. En: Soutullo, A., Clavijo, C. y Martínez-Lanfranco, J.A., eds. *Especies prioritarias para la conservación en Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares*. Montevideo: SNAP, DINAMA y DICYT. pp.175-207.
- Grilo, C., Bissonette, J.A. y Santos-Reis, M., 2009. Spatial-temporal patterns in Mediterranean carnivore road casualties: consequences for mitigation. En: *Biological Conservation*, 142(2), pp.301-313.
- Guhimre, B., Rogan, J. y Miller, J., 2010. Contextual land-cover classification: incorporating spatial dependence in land-cover classification models using random forests and the Getis statistic. En: *Remote Sensing Letters*, 1(1), pp.45-54.
- Hastie, T.J., Tibshirani, R.J. y Friedman, J.H., 2001. *The elements of statistical learning: data mining, inference, and prediction*. New York: Springer.
- Kerley, L.L., Goodrich, J.M., Miquelle, D.G., Smirnov, E.N., Quigley, H.B. y Hornocker, M.G., 2002. Effects of roads and human disturbance on Amur tigers. En: *Conservation Biology*, 16(1), pp.97-108.
- Malo, J.E., Suárez, F. y Diez, A., 2004. Can we mitigate animal-vehicle accidents using predictive models? En: *Journal of Applied Ecology*, 41(4), pp.701-710.
- Mateo, R.G., Felicísimo, Á.M. y Muñoz, J., 2011. Modelos de distribución de especies: una revisión sintética. En: *Revista Chilena de Historia Natural*, 84(2), pp.217-240.
- Liaw, A. y Wiener, M., 2002. Classification and regression by random Forest. En: *R News*, 2(3), pp.18-22.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2006. *Prescripciones técnicas para el diseño de pasos de fauna y vallados perimetrales*. Madrid: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. (Documentos para la reducción de la fragmentación de hábitats causada por infraestructuras de transportes, 1).
- Puc-Sánchez, J.I., Delgado-Trejo, C., Mendoza-Ramírez, E. y Suazo-Ortuño, I., 2013. Las carreteras como una fuente de mortalidad de fauna silvestre en México. En: *CONABIO Biodiversitas*, 11, pp.12-16.

- Prasad, A.M., Iverson, L.R. y Liaw, A., 2006. Newer classification and regression tree techniques: bagging and random forests for ecological prediction. En: *Ecosystems*, 9(2), pp.181- 199.
- Santos, A.M. y Tabarelli, M., 2002. Distance from roads and cities as a predictor of habitat loss and fragmentation in the Caatinga vegetation of Brazil. En: *Brazilian Journal of Biology*, 62(4B), pp.897-905.
- Schmidt, K., Behrens, T. y Scholten, T., 2008. Instance selection and classification tree analysis for large spatial datasets in digital soil mapping. En: *Geoderma*, 146, pp.138-146.
- 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.
- Seiler, A. y Helldin, J.O., 2006. Mortality in wildlife due to transportation. En: Davenport, John y Davenport, Julia, L., eds. *The ecology of transportation: managing mobility for the environment*. Amsterdam: Springer. pp.165-189.
- Pino Cubiles, Patricia, 2017. *Evaluación del riesgo crediticio mediante árboles de clasificación y bosques aleatorios* [En línea]. Sevilla: Universidad de Sevilla. [Consulta: 10/2/2020]. Disponible en: <http://bibing.us.es/proyectos/abreproy/91149/fichero/MEMORIATFG.pdf>
- R-Core Team, 2019. R: *A language and environment for statistical computing* [En línea]. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. [Consulta: 8/6/2020]. En: <https://www.R-project.org/>.
- Taylor, B.D. y Goldingay, R.L., 2004. Wildlife road-kills on three major roads in north-eastern New South Wales. En: *Wildlife Research*, 31, pp.83-89.
- Torres, A., Velázquez, A. y Lobato, J., 2003. Riqueza, diversidad y patrones de distribución espacial de los mamíferos. En: Velázquez, A., Torres, A. y Bocco, G., comp. *Las enseñanzas de San Juan. Investigación participativa para el manejo integral de recursos naturales*. México: Instituto Nacional de Ecología. pp.277-299.