



Universidad Tecnológica Nacional
Facultad Regional La Plata

Estudio comparativo de la efectividad
molusquicida de hipoclorito de sodio y
Bioxi B sobre los moluscos incrustantes

Limnoperna fortunei

Tesis de Maestría en Ingeniería Ambiental

Tesista: Lic. Virginia Martinez

Directora: Dra. Leda Giannuzzi

La Plata, Argentina

2021



El presente trabajo fue realizado en la Cátedra de Toxicología de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata y en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de la empresa SABINUR, bajo la dirección de la Dra. Leda Giannuzzi para obtener el título de magister en Ingeniería Ambiental.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a todos los miembros de la Facultad Regional La Plata de la Universidad Tecnológica Nacional (UTN-FRLP) y a los docentes de la Maestría en Ingeniería Ambiental, por sus conocimientos y aportes a mi formación académica.

Quiero agradecer al Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.

Quiero agradecer especialmente al presidente de la empresa SABINUR Dr. Carlos Reigosa y al equipo de la empresa por brindarme el espacio en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo.

A mi directora de tesis Dra. Leda Giannuzzi, por su apoyo constante, por compartir sus conocimientos y experiencias conmigo, por sus correcciones a la presente Tesis y por sobre todas las cosas por su calidad humana.

Dedicado a mi madre Susana.

INDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. IMPACTO AMBIENTAL Y ECONÓMICO DE LA INVASIÓN DEL MEJILLÓN DORADO (1)

1.1.1. Impacto ambiental del mejillón dorado (1)

1.1.2. Impacto económico del mejillón dorado (3)

1.2. LA INVASIÓN DEL MEJILLÓN DORADO EN LA CUENCA DEL PLATA (7)

1.2.1. Primera década de invasión 1991-2000 (7)

1.2.2. Segunda década de invasión 2001-2010 (8)

1.2.3. Tercera década de invasión 2011-actualidad (9)

1.3. BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA DEL MEJILLÓN DORADO (11)

1.3.1. Características generales del mejillón dorado: anatomía, biología y ecología (12)

1.3.1.1. Anatomía del mejillón dorado (12)

1.3.1.2. Reproducción y ciclo de vida (13)

1.3.1.3. Mecanismos de dispersión y modo de vida (14)

1.3.1.4. Hábitat y condiciones ambientales límites para el mejillón dorado (15)

1.3.1.5. Alimentación del mejillón dorado por filtración (16)

1.4. CONTROL DEL MEJILLÓN DORADO (17)

1.4.1. Compuestos químicos no oxidantes evaluados para la prevención y el control del mejillón dorado (18)

1.4.2. Compuestos químicos oxidantes evaluados para la prevención y el control del mejillón dorado (19)

1.4.2.1. Cloración para el control del mejillón dorado (19)

1.4.2.2. Dióxido de cloro para el control del mejillón dorado (21)

1.4.2.3. Ozonización para el control del mejillón dorado (21)

1.4.2.4. Permanganato de potasio para el control del mejillón dorado (22)

1.4.2.5. Peróxido de hidrógeno para el control del mejillón dorado (22)

1.4.2.6. Dicloroisocianurato de sodio para el control del mejillón dorado (22)

1.4.2.7. Compuestos oxidantes utilizados en los sistemas hidráulicos de las industrias para la prevención y el control del mejillón dorado (24)

1.5. Características del cloro y el ácido peracético como biocida ideal (24)

1.5.1. Características del cloro (24)

1.5.2. Características del ácido peracético (26)

1.5.2.1. Propiedades químicas del ácido peracético (26)

- 1.5.2.2. Propiedades del ácido peracético como biocida (27)
- 1.5.2.3. Subproductos de la desinfección con ácido peracético (28)
- 1.5.2.4. Reacciones del APA en solución acuosa (28)

- 1.6. OBJETIVOS DEL TRABAJO (31)
- 1.6.1. Objetivo general (31)
- 1.6.2. Objetivos específicos (31)

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

- 2.1. OBTENCIÓN DE LOS MEJILLONES DORADOS (32)
- 2.2. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AGUA DE RÍO (34)
 - 2.2.1. pH (SM-4500H+ B) (34)
 - 2.2.2. Temperatura (SM-2550) (34)
 - 2.2.3. Color (SM-2120-C) (34)
 - 2.2.4. Salinidad (SM-2520 B) (34)
 - 2.2.5. Turbidez (SM-2130 B) (35)
 - 2.2.6. Conductividad (SM-2510) (35)
 - 2.2.7. Metales (SM-3500 As, SM-3500 Fe, SM-3500 Mn, SM-3500 Pb, SM-3500-Cr) (35)
 - 2.2.8. Sólidos suspendidos totales (SM-2540 D) (35)
 - 2.2.9. Sólidos disueltos totales (SM-2540 C) (35)
 - 2.2.10. Oxígeno disuelto (SM-4500 O G) (35)
 - 2.2.11. Nitrógeno amoniacal (36)
 - 2.2.12. Demanda química de oxígeno (SM-5220 D) (36)
 - 2.2.13. Demanda bioquímica de oxígeno (SM-5210 B) (36)
 - 2.2.14. Demanda de cloro (36)
 - 2.2.15. Clorofila a (SM-10200 H) (37)
 - 2.2.16. Recuento de bacterias heterótrofas totales (SM-9215B) (37)
 - 2.2.17. Coliformes fecales (SM-9225) (37)
 - 2.2.18. Recuento y análisis de fitoplancton (SM-10200 F) (38)
- 2.3. PRODUCTOS MOLUSQUICIDAS (38)
 - 2.3.1. Hipoclorito de sodio (38)
 - 2.3.1.1. Determinación de principio activo cloro (38)
 - 2.3.1.2. Determinación de cloro residual (39)

- 2.3.2. Sanurfloc Bioxi B (39)
 - 2.3.2.1. Determinación de principio activo ácido peracético (39)
 - 2.3.2.2. Determinación de ácido peracético residual (39)
- 2.4. ADAPTACIÓN DEL MEJILLON DORADO AL LABORATORIO (40)
 - 2.4.1. Procesamiento de muestras de mejillón dorado (40)
 - 2.4.2. Puesta a punto y selección de las condiciones de ensayo de aclimatación de los mejillones dorados (41)
- 2.5. ENSAYO DE EFECTIVIDAD MOLUSQUICIDA (41)
 - 2.5.1. Puesta a punto de la técnica para la determinación de la mortalidad del mejillón dorado bajo tratamientos con cloro (41)
 - 2.5.2. Protocolo de mortalidad del mejillón dorado bajo tratamientos con cloro y Sanurfloc Bioxi B (42)
 - 2.5.3. Ensayo de combinaciones de Sanurfloc Bioxi B y cloro en forma secuencial (43)
- 2.6. CRITERIOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA MOVILIDAD, ADHESIÓN, FILTRACIÓN POR LOS PRODUCTOS OXIDANTES (43)
- 2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS (48)

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSION

- 3.1. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA BIOLÓGICO (49)
 - 3.1.1. Resultados de la caracterización fisicoquímica y microbiológica del medio acuoso (49)
- 3.2. RESULTADOS DE LA PUESTA A PUNTO DE LA ACLIMATACIÓN (52)
- 3.3. EFECTO DE SANURFLOC BIOXI B Y CLORO SOBRE LA MORTALIDAD DEL MEJILLON DORADO (53)
 - 3.3.1. La mortalidad del mejillón dorado bajo los tratamientos con cloro (53)
 - 3.3.2. La mortalidad del mejillón dorado bajo los tratamientos con Sanurfloc Bioxi B (56)
 - 3.3.3. Comparación de la Dosis letal 50 (DL50) de activo B (activo de Sanurfloc Bioxi B) y cloro a distintos tiempos de contacto sobre el mejillón dorado (58)
 - 3.3.4. Análisis de la mortalidad del mejillón dorado bajo la combinación secuencial de Sanurfloc Bioxi B y cloro (60)
- 3.4. EFECTOS DE SANURFLOC BIOXI B, CLORO Y SUS COMBINACIONES SOBRE LA MOVILIDAD: CAPACIDAD DE ASCENSO SOBRE SUSTRATO (63)
 - 3.4.1. Capacidad de ascenso del mejillón dorado (63)
 - 3.4.2. Efectos del producto Sanurfloc Bioxi B, cloro y sus combinaciones sobre la capacidad de ascenso del mejillón dorado (64)
- 3.5. EFECTOS DE SANURFLOC BIOXI B, CLORO Y SUS COMBINACIONES SOBRE LA CAPACIDAD DE ADHESIÓN AL SUSTRATO DEL MEJILLON DORADO (67)

3.6. EFECTO DE SANURFLOC BIOXI B, CLORO Y SUS COMBINACIONES SOBRE LA FILTRACIÓN DEL MEJILLON DORADO (71)

3.6.1. Análisis de los efectos de Sanurfloc Bioxi B y cloro y sus combinaciones sobre la filtración mediante inspección visual de la exposición de los sifones al medio (71)

3.6.2. Análisis de los efectos de Sanurfloc Bioxi B, cloro y sus combinaciones sobre la tasa de filtración de colorante rojo neutro (73)

3.7. COMPARACIÓN DE EFECTOS DE SANURFLOC BIOXI B, CLORO Y SUS COMBINACIONES SOBRE LA MORTALIDAD, MOVILIDAD, ADHESION Y FILTRACION DEL MEJILLON DORADO (76)

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

4.1. SINTESIS: MORTALIDAD DEL MEJILLÓN DORADO BAJO LOS TRATAMIENTOS CON SANURFLOC BIOXI B, CLORO Y SUS COMBINACIONES (77)

4.2. SÍNTESIS: EFECTOS DE SANURFLOC BIOXI B, CLORO Y SUS COMBINACIONES SOBRE LA MOVILIDAD, LA ADHESIÓN Y LA TASA DE FILTRACIÓN DEL MEJILLÓN DORADO (78)

4.3. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS (78)

BIBLIOGRAFÍA

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. IMPACTO AMBIENTAL Y ECONÓMICO DE LA INVASIÓN DEL MEJILLÓN DORADO

El mejillón dorado, *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), es una especie de molusco bivalvo introducida en la Cuenca del Plata. Es un mejillón de agua dulce, de hábito de vida epifaunal (organismo que habita sobre la superficie de un sustrato duro de los ambientes acuáticos). *L. fortunei* se alimenta por filtración, presenta comportamiento gregario, sus larvas son planctónicas, es un organismo de vida corta, crecimiento rápido, rápida maduración sexual y alta fecundidad (Darrigran y Damborenea, 2011). En vista de las características biológicas y ecológicas del molusco, así como el ambiente favorable en los países sudamericanos para su proliferación, el mejillón dorado se ha convertido en una **especie exótica invasora**. La invasión biológica de esta especie ha causado impactos ambientales y económicos, que causaron cambios estructurales y funcionales en los ecosistemas y daño a las actividades humanas (Darrigran y Damborenea, 2011).

Según la definición del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (MADS), el **impacto ambiental** se define como toda modificación significativa, positiva o negativa, producida sobre el ambiente y la calidad de vida de la población como consecuencia del desarrollo de obras o actividades (<https://www.argentina.gob.ar/ambiente/desarrollo-sostenible/evaluacion-ambiental/guias-de-evaluacion-ambiental/esia>). El comercio marítimo es una actividad humana que ha tenido como consecuencia la introducción, en forma no intencional, del mejillón dorado en América del Sur a través del agua de lastre, y que ha logrado invadir la Cuenca del Plata (ríos Río de la Plata, Uruguay, Paraná, Paraguay y cuerpos de agua anexos), la Cuenca del Guaíba y la Cuenca del San Francisco (Matschke, 2020).

1.1.1. Impacto ambiental del mejillón dorado

El mejillón dorado se ha encontrado con una densidad máxima de 170.000 ind./m² de individuos adultos en el Río de la Plata (Darrigran y col., 2003), una densidad máxima de 210.000 ind./m² de individuos con una longitud valvar menor a 1 mm en el Delta del Paraná (Sylvester, 2006; Sylvester y col., 2007a), y hasta 701.000 ind./m² en la playa Bagliardi (Spaccesi y Rodrigues, 2012). La densidad de mejillones adultos (> 5-7 mm) suelen encontrarse por debajo de 10.000 ind./m² (Correa y col., 2015). En la Figura 1.1 se muestran las colonias de mejillón dorado en las costas del Lago San Roque, Carlos Paz (Córdoba).

Por su parte, las densidades larvarias más altas registradas de *L. fortunei* fueron de alrededor de 100.000 ind./m³ (Darrigran y col., 2007; Nakano y col. 2010), pero tales valores son excepcionales. Durante los meses de máxima reproducción, las densidades larvarias oscilan normalmente entre 6000 y 7000 ind./m³, mientras que en junio-septiembre descienden a < 1000 ind./m³ (Boltovskoy y col., 2015a).



Figura 1.1. Colonias de mejillón dorado sobre la costa del Lago San Roque, Carlos Paz (Córdoba), noviembre 2020. Fotografías: Viviana Martínez para esta tesis.

Al igual que la gran mayoría de los bivalvos, tanto de agua dulce como marinos, *L. fortunei* se alimenta de partículas de material orgánico suspendidas en el agua. Para ello filtra el líquido a través de las branquias, estructuras especializadas que retienen el material particulado, parte del cual es ingerido. La cantidad de material nutritivo presente en las aguas de ríos y lagos es normalmente muy baja, generalmente menos de 1 mg por litro, motivo por el cual los organismos filtradores deben procesar volúmenes de agua muy altos para satisfacer sus demandas energéticas, de crecimiento y reproductivas (Sylvester y col., 2006). En consecuencia, cuando la densidad poblacional que se alimenta de esta manera es alta, su actividad filtradora suele afectar profundamente a los ecosistemas donde habitan. La actividad alimentaria de estos bivalvos aumentan las concentraciones de nutrientes y alteran sus proporciones, en particular, aumenta la proporción de fósforo a nitrógeno (P: N) (Conroy y Culver, 2005; Cataldo y col. 2012b).

El mejillón dorado tiene una alimentación no selectiva, siendo capaz de consumir todos los tipos algales e incluso organismos del zooplancton (Rojas Molina y col., 2010, 2012; Cataldo y col., 2012a; Frau y col., 2013). Sin embargo, el bivalvo presenta un mayor consumo de partículas pequeñas (< 1mm) mientras que el plancton de mayor tamaño se selecciona negativamente. Dada las elevadas tasas de clareado del agua (Sylvester y col., 2005), la alimentación de estos moluscos filtradores impacta de la siguiente manera: por un lado, el material particulado es extraído de la columna de agua y transferido a los sedimentos (como heces o pseudoheces), como consecuencia el agua es más transparente y se incrementa la penetración de la luz en la columna de agua. El fondo es enriquecido con material orgánico, y se activa la degradación y mineralización, lo cual afecta las cantidades de nutrientes inorgánicos en la columna de agua, incidiendo sobre la cantidad y tipo de fitoplancton. Se crea un medio propicio para el crecimiento de hidrófitas (Matschke, 2020).

Debido a la alta capacidad reproductiva de este bivalvo, las poblaciones crecen rápidamente formando densas y homogéneas capas de mejillones modificando la biodiversidad bentónica. Los bivalvos nativos infaunales que, por su típica forma de vida dejan expuesta 1/3 de su conchilla, son utilizados por *L. fortunei* para fijarse y hacen que estas especies nativas se vean imposibilitadas de poder moverse (enterrarse o semi-desenterrarse) o abrir o cerrar sus valvas, a medida que estos mejillones lo usan como sustrato y compiten por el alimento. Estas especies,

al igual que otros invertebrados y plantas acuáticas se ven desplazados, son obligados a migrar debido a ese cambio de hábitat (Darrigran y Damborenea, 2006a; Matschke, 2020).

El establecimiento del mejillón dorado en la Cuenca del Plata fue la primera incorporación de un bivalvo epifaunal a la comunidad de agua dulce, alterando la abundancia y composición de las comunidades de macroinvertebrados bentónicos. Esas densas poblaciones de *L. fortunei*, crearon un microhábitat para diferentes taxas de invertebrados. Las invasiones de *L. fortunei* pueden generar eliminación de diferencias regionales en la fauna bentónica afectando a la biodiversidad nativa; y la gran biomasa asociada a las altas densidades del mejillón puede impactar en las cadenas alimentarias. Según Darrigran (2002) el hábito de vida es atípico para el agua dulce de la Región Neotropical, ya que en general los bivalvos de agua dulce presentan una forma de vida infaunal y en cambio el mejillón dorado lo hace en forma epifaunal ocupando así un nicho previamente vacante y no teniendo por el momento algún tipo de competencia interespecífica que afecte negativamente su presencia en el ambiente. Sí presenta en cambio depredadores como peces. Se encontró que la boga común (*Leporinus obtusidens Valenciennes*, 1846) en el Río de la Plata experimentó un cambio de dieta alimentándose casi exclusivamente de *L. fortunei* (Penchaszadeh y col., 2000). Por otra parte, Cataldo (2015) señala que existen casi 50 especies de peces que se alimentan del mejillón dorado. Pero a pesar de que existan estos depredadores, este hecho no se considera suficiente como reguladora de las poblaciones de *L. fortunei*.

Además de los peces, se ha sugerido que hay especies de mamíferos acuáticos, aves y numerosos invertebrados (crustáceos, hirudíneos, gasterópodos) que pueden consumir o preñar sobre *L. fortunei* (Darrigran y col., 1998; Sylvester y col., 2007a, b).

Las acciones específicas de manejo ambiental del mejillón dorado en el Río de la Plata, pueden clasificarse en medidas de prevención, planes de erradicación y control. Sin embargo las acciones de erradicación no son actualmente factibles, debido al extenso territorio invadido desde su ingreso hace 30 años (Matschke, 2020).

1.1.2. Impacto económico del mejillón dorado

Los efectos potenciales y conocidos del mejillón dorado sobre el ecosistema son difíciles de calificar. Algunos de ellos son claramente negativos desde el punto de vista del aprovechamiento del recurso hídrico por parte del hombre, pero hay otros que podrían ser neutros y algunos positivos. Por otro lado, prácticamente todos los impactos provocados por *L. fortunei* en los sistemas industriales que utilizan aguas invadidas con el bivalvo para sus procesos, han sido negativos (Cataldo y col., 2003; Perepelizin y Boltovskoy, 2011; Perepelizin, 2011). Se han observado serios inconvenientes como el taponamiento de los filtros y las rejillas de las tomas de agua, así como de caños, intercambiadores de calor, condensadores y otros equipos que representan las dificultades más comunes para las industrias y plantas de generación de energía que utilizan agua sin tratamiento de ríos y lagos en sus procesos, en especial para refrigeración (Cataldo y col., 2003; Perepelizin, 2011).

Darrigran y Damborenea (2006) resumen los problemas causados en la región neotropical con seis puntos principales:

- 1.- Reducción de los diámetros de las cañerías.
- 2.- Bloqueo de cañerías.

- 3.- Decrecimiento de la velocidad del agua (esto se debe a que el sistema está diseñado para que el agua circule con flujo laminar, pero la fijación de los mejillones a las paredes ocasionan un flujo turbulento; por lo tanto, para la circulación de la misma cantidad de agua, el intervalo de tiempo será mayor).
- 4.- Oclusión por acumulación de valvas vacías.
- 5.- Contaminación del agua en el interior del sistema.
- 6.- Bloqueo de filtros.

En la Figura 1.2 se muestran las incrustaciones del mejillón dorado sobre diversos equipos y estructuras.

En China y Sudamérica, se han presentado graves problemas de bioincrustaciones causados por el mejillón dorado, en numerosas instalaciones industriales, incluidas plantas de tratamiento de agua, plantas de tratamiento de efluentes, plantas de energía nuclear, hidroeléctrica y térmica; refinerías, acerías, canales de transferencia de agua, acueductos y embarcaciones (Boltovskoy y col., 2015b).

En la Planta Potabilizadora de la ciudad de La Plata se registró el primer caso conocido de macrofouling ocasionado por el mejillón dorado, para agua dulce de América del Sur (Darrigran, 1995). El macrofouling, en sentido amplio, es el asentamiento y crecimiento (colonización) de organismos de más de 50 micrones de tamaño, sobre cualquier sustrato sumergido o artificial (Pérez y Stupak, 1996). Otros casos de macrofouling ocurrieron con posterioridad en las tomas de agua para consumo humano de Bernal y de la Ciudad de Buenos Aires (Darrigran y Ezcurra de Drago, 2000; Darrigran, 1995).

El mejillón dorado fue hallado en la Central Hidroeléctrica de Yacyretá (Argentina- Paraguay) en la Central Hidroeléctrica de Itaipú (Brasil-Paraguay; Zanella y Marena, 2002) y en una de las Plantas Nucleares generadoras de energía de Argentina del Embalse Río Tercero (Darrigran y Dreher Mansur; 2006). De Madrignac Belledonne y Oviedo Benitez (2012), describen que el mejillón dorado se transformó rápidamente en un problema económico para las hidroeléctricas generadoras de energía eléctrica y demás industrias que utilizan el agua de ríos para sus procesos, interfiriendo en el caudal del agua, provocando obstrucción de canales, filtros, bombas, condensadores, intercambiadores y turbinas. Otros trastornos se refieren a la reducción de la velocidad del flujo causada por pérdidas debido a la fricción, acumulación de barreras y obstrucción de tuberías debido a la mortalidad masiva, acumulación de valvas vacías y contaminación de aguas por descomposición de materia orgánica, aumento de la corrosión y rugosidad en las tuberías y estructuras debido al crecimiento de hongos y bacterias asociados, generando aumento de gastos financieros y operacionales con la consecuente reducción de eficiencia. Además de eso, este molusco se desarrolla en rejillas y componentes de hidroeléctricas, obligando a promover una constante operación de limpieza que interfiere en el aumento de las horas hombre en el mantenimiento.

Si bien se han realizado estimaciones y esfuerzos en la recopilación de datos, actualmente no se cuenta con información precisa sobre el costo económico que implica la prevención y control del mejillón dorado en las industrias que utilizan agua de río (Matschke, 2020). *L. fortunei* también genera pérdidas no cuantificadas no sólo en embarcaciones comerciales, sino también en embarcaciones de recreo, ya que se adhiere al casco así como a otras partes sumergidas o en contacto con el agua de refrigeración o de servicio (filtros, patas de motor, timones, válvulas, etc.), afectando a su funcionamiento e hidrodinámica, acelerando los procesos de corrosión y

exigiendo, por tanto, limpieza y mantenimiento adicional (Darrigran, 2002; Darrigran y Damborenea, 2005; Sylvester, 2006).

En relación a los métodos de prevención y control, Darrigran y Damborenea (2006) indican que la forma de afrontar el problema en las industrias es a través de respuestas a una serie de preguntas simples.

La primera pregunta interroga: ¿la planta será invadida por *L. fortunei*? Los autores afirman que la respuesta es afirmativa para todas las instalaciones que tomen agua en forma directa de cuencas que estén invadidas por mejillón dorado.

Luego de tener la certeza de la invasión de la planta por el bivalvo, surgen nuevas preguntas: ¿es debido actuar?, ¿cuáles son las estructuras que se deben proteger? y ¿de qué forma? La respuesta a las dos primeras preguntas, dependen del momento en que éstas se formulen; es decir, si:

(a) todavía no ha llegado el mejillón dorado a la planta, entonces la estrategia de acción será de **protección/ prevención**;

(b) ya se ha detectado la presencia de ejemplares del mejillón dorado en la planta, entonces la estrategia de acción serán de **reacción/control**, de acuerdo al grado de desarrollo de la población de mejillones dentro de la planta.

En estos casos, el especialista encargado del asesoramiento debe conocer una serie de datos básicos:

1. Estructura y funcionamiento de la planta a prevenir.
2. Biología del organismo en el ambiente en particular.
3. Distribución geográfica y capacidad de dispersión.
4. Qué problemas originó en las plantas de la región, como así también una serie de acciones en forma simultánea de difusión para brindar información/asesoramiento a los profesionales y personal de la planta.

En el título siguiente se describe cronológicamente la invasión del mejillón dorado en la Cuenca del Plata, luego se presenta su biología y ecología, finalmente se presentan estrategias de prevención y control del mejillón dorado.

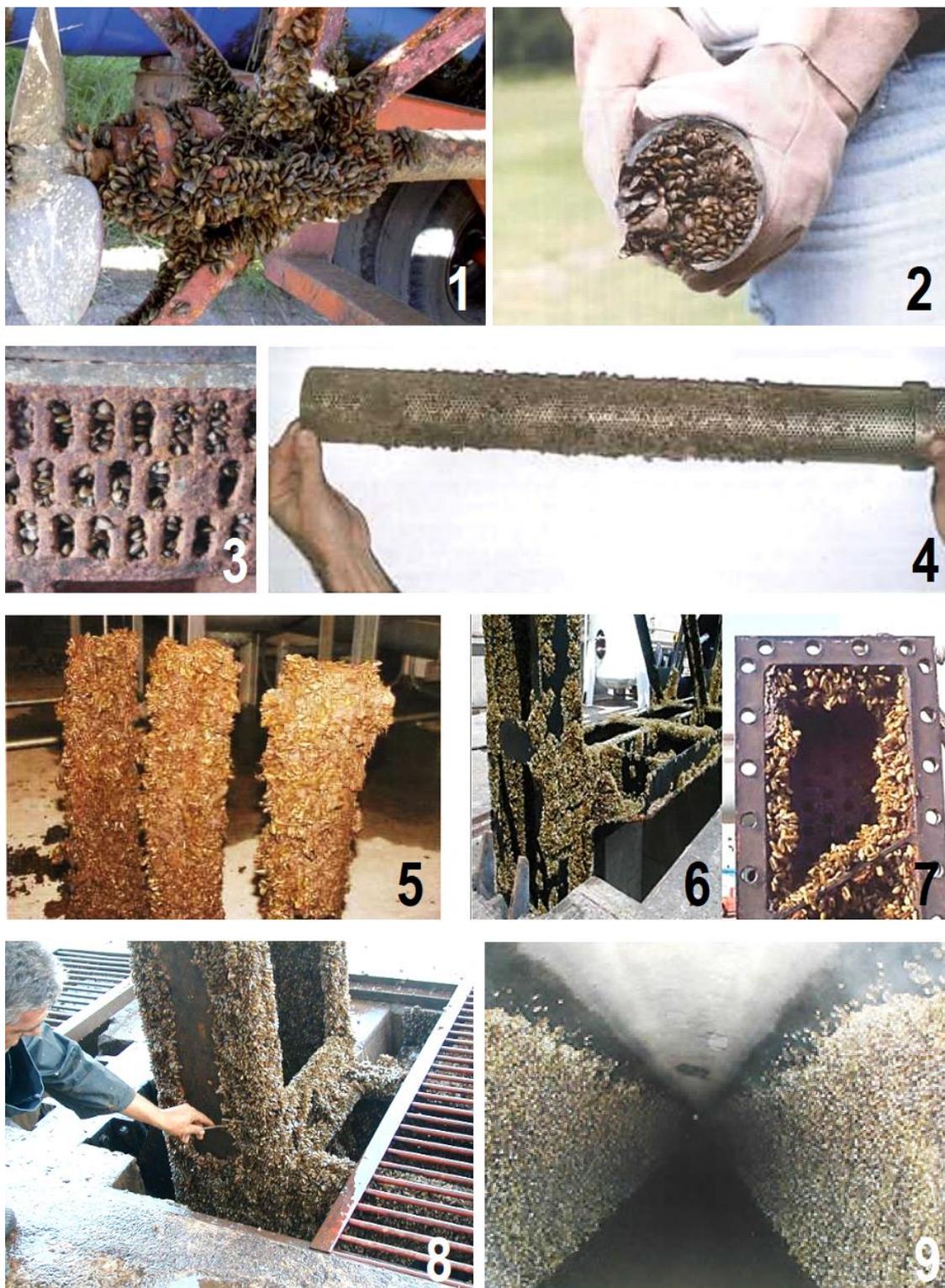


Figura 1.2. Incrustaciones de mejillón dorado. (1) Hélice de una casa flotante en Embalse Río Tercero, Córdoba; fotografía: www.fcen.uba.ar/fotovideo/EXm/NotasEXm49/exm49ecologia.pdf (2) Bioincrustación en una sección de tubería metálica; fotografía: N. García Romero (3) Intercambiador de calor en la Central Hidroeléctrica de Itaipú; fotografía: Hernán Oviedo Antunes, (4) Filtro de agua de refrigeración de una unidad generadora de energía; fotografía: M.C. Damborenea (5) Filtro de agua de refrigeración de una unidad generadora de energía; fotografía: www.malacologia.com.ar (6) y (7) Estructuras hidráulicas en los Embalses del Río Negro, fotografía: Brugnoli. (8) Estructura hidráulica; fotografía: http://inbuy.fcien.edu.uy/fichas_de_especies/indexPublicaciones.html (9) Toma de agua de planta potabilizadora con paredes cubiertas por el mejillón dorado. <https://www.eldia.com/nota/2009-11-23-investigacion-plaga-que-puede-afectar-el-agua-potable>

1.2. LA INVASIÓN DEL MEJILLÓN DORADO EN LA CUENCA DEL PLATA

1.2.1. Primera década de invasión 1991-2000

El mejillón dorado, es un molusco bivalvo invasor de agua dulce originario de ríos y arroyos de China y el sudoeste de Asia que invadió Hong Kong en 1965 (Morton, 1973), Japón (Kimura, 1994) y Taiwán (Ricciardi, 1998) en la década de 1990.

El ingreso accidental de la especie invasora en la Cuenca del Plata, fue presumiblemente a través de embarcaciones comerciales transoceánicas que vertían el agua de lastre con larvas de mejillón dorado, en los puertos rioplatenses. El mejillón dorado fue detectado por primera vez en las playas del balneario Bagliardi en Berisso, a 20 km de la ciudad de La Plata (Argentina), en el año 1991 (Pastorino y col., 1993). Esta especie ha avanzado a una velocidad aproximada a los 240 km por año, a través de la Cuenca del Plata (Darrigran y Ezcurra de Drago, 2000), se ha adaptado y esparcido por el todo el territorio y ha ampliado significativamente su área de dispersión. A fines de 1993, se observó su presencia desde Punta Piedras hasta el Balneario Punta Lara (Darrigran y Pastorino, 1993). El mejillón dorado se extendió río arriba y colonizó el lado argentino del Río de la Plata, llegando a la Isla Martín García y el delta inferior del Río Paraná en 1995 (Darrigran y Pastorino, 2004; Boltovskoy y col., 2006). En 1994, se informó el primer episodio de macrofouling para el agua dulce de América del Sur, causado por el mejillón dorado de una planta de tratamiento de agua en la ciudad de La Plata, Argentina (Darrigran 1995). Hasta 1997 solo se lo hallaba en el Río Paraná y el Río de la Plata, y no había pasado aguas arriba de Zárate. De 1991 a 1998, *L. fortunei* colonizó un área extensa de la Cuenca del Plata, aguas arriba de las ciudades de Rosario (1995) y Corrientes (1996), llegando a la represa de Yacyretá (Figura 1.3), donde se registró por primera vez en 1998 (Darrigran y Pastorino 2004; Boltovskoy y col., 2006). *L. fortunei* se registró por primera vez en el Embalse de Río Tercero en 1998 (Boltovskoy y col., 2006, 2009), dado que ninguno de los ríos que drenan al embalse es navegable, se estima que el mejillón dorado fue introducido por una ruta terrestre, muy probablemente unida al casco de un barco recreativo remolcado por tierra desde algún lugar en los ríos Paraná o Uruguay (Boltovskoy y col., 2006). Las instalaciones de energía hidroeléctrica Embalse de Río Tercero y Piedras Moras, así como las instalaciones de energía nuclear de la Central Embalse, asociadas con estas represas experimentaron problemas de incrustación debido al mejillón desde alrededor del año 2000 (Darrigran y Dreher Mansur; 2006)

El primer registro de *L. fortunei* en el lado uruguayo del Río de la Plata fue en 1994 (Scarabino y Verde, 1994), ese año se encontró en Colonia Uruguay y en Playa Pascual. En el año 1996, *L. fortunei* se registró en el Río Santa Lucía (Brugnoli y col., 2005).

En 1997, *L. fortunei* se registró por primera vez en el río Paraguay en Asunción (Paraguay), y en 1998 en Corumbá (Mato Grosso do Sul-Brasil), en el sur del Pantanal (Oliveira y Barros, 2003). Un afluente importante del Paraná es el río Paraguay, que drena el humedal Pantanal, uno de los humedales más grandes del mundo y considerado un área de gran importancia ecológica. En Brasil, se lo localizó a fines de 1998 en la Cuenca del Guaíba, Puerto Alegre, Río Grande Do Sul (Mansur y col., 2003)



Figura 1.3. Represa del Ente Binacional Yacyretá. Se observan las paredes de hormigón de las cámaras espiral de las unidades generadoras, totalmente colonizadas con incrustaciones de mejillón dorado. La limpieza de la cámara espiral se realiza mecánicamente, desprendiendo los mejillones de las paredes y volcándolos en contenedores para su disposición. Fuente: <https://www.eby.org.ar/limpiezacamaraespiral>

1.2.2 Segunda década de invasión 2001-2010

En el año 2001, el mejillón dorado llegó hasta la central hidroeléctrica binacional (Argentina-Uruguay) Salto Grande por el río Uruguay (Darrigran y col., 2012; Spaccesi, 2013; Oliveira y col., 2015). Desde su introducción, como ya se ha dicho avanzó río arriba a una velocidad de alrededor de 240 km por año y se asentó en aproximadamente 1100 km de cursos de agua de la Cuenca del Plata. Ese mismo año, se registró la presencia de *L. fortunei* en la Central Hidroeléctrica de Itaipú compartida por Brasil y Paraguay (Darrigran, 2002; Zanella y Marenda, 2002). En 2006, se registró al final de la cola del embalse de Salto Grande de 120 km de longitud, y alrededor de 2008 se informó en el río Quaraí, un afluente del río Uruguay (Lima y col., 2008).

En 2001 continuó la invasión sobre Uruguay, el mejillón fue encontrado en el puerto de Nueva Palmira, y en 2002 más al este a lo largo de la costa del Río de la Plata (Punta Espinillo y la ciudad de Montevideo), disminuyendo hacia el mar a medida que aumentan las salinidades (Brugnoli y col., 2005). Los principales afluentes del río Uruguay son el Río Negro (y su afluente el Río Yí), en Uruguay; y los Ríos Ijuí, Piratini, Ibicuí y Quaraí en Brasil. En el año 1999, *L. fortunei* se registró

en el río Negro en la represa Palmar y en el año 2002, en el río Yí (Clemente y Brugnoli, 2002; Conde y col., 2002).

La ausencia del mejillón dorado en los ríos Pilcomayo, Bermejo y en el Río Salado, es posible que sea debida a las altas concentraciones de sedimentos suspendidos, entre 100–4500 mg/l del Río Bermejo, el flujo intermitente del Pilcomayo y las altas salinidades del Río Salado (Drago y col., 2008; Darrigran y col., 2011).

En el río Paraguay, la distribución del mejillón dorado es heterogénea, siendo más frecuente en áreas con afloramientos rocosos. La especie también habita en extensos lagos conectados al río Paraguay y en los tramos medio y bajo de algunos afluentes, incluidos los ríos Apá (desde 2000), Miranda (desde 2003) y Cuiabá (desde 2008). Además del río Paraguay, que define la frontera entre Brasil y Bolivia, también se han invadido algunos otros cuerpos de agua bolivianos, aunque la distribución del mejillón en Bolivia es prácticamente desconocida (Oliveira y col., 2015)

En el 2004, el mejillón dorado fue encontrado en San Pablo, Brasil. Río arriba de Itaipú, el río Paraná tiene tres grandes represas (Porto Primavera, Jupíá e Ilha Solteira), todas ellas fueron colonizadas por el mejillón entre 2002 y 2004 (Rückert y col., 2004). Extendiéndose río arriba a lo largo de la vía fluvial Paraná – Tietê, *L. fortunei* se expandió hacia el norte llegando al río Paranaíba en 2004. En el Río Tietê hay siete represas principales, todas ellas colonizadas por *L. fortunei* en el periodo de 2002 a 2006 (Avelar y col., 2004; Pareschi y col., 2008). El registro de la presencia de mejillón dorado más aguas arriba del Río Tietê es en la represa Barra Bonita, donde ha estado presente desde 2005. En el río Paranapanema, *L. fortunei* se registró en 2002 en la represa Rosana, y posteriormente en las represas Xavantes, Capivara y Jurumirim. El río Piquiri también fue colonizado por *L. fortunei*, pero el río Ivaí aparentemente aún no ha sido invadido (Pestana y col., 2010). *L. fortunei* ha estado presente en el río Iguazú desde 2003 y alcanzó su cabecera (ciudad de Porto Amazonas, Brasil), alrededor de 850 km río arriba en el 2008 (Takeda y col., 2003; Pestana y col., 2010).

1.2.3 Tercera década de invasión 2011-actualidad

La tercera década de invasión se despliega principalmente en Brasil. El río Uruguay se origina en la confluencia de los ríos Pelotas y Canoas en Brasil, y fluye durante 1770 km antes de desembocar en el Río de la Plata. En la ciudad de Uruguayana (Brasil), se encontró en 2011. Los registros aguas arriba más lejanos en el río Uruguay están en la represa de Itá, y entre la ciudad de Machadinho y la presa de Barra Grande (río Pelotas), a unos 1600 km de la desembocadura del río en el Río de la Plata (Agudo- Padrón y col., 2012;). Estos registros sugieren que todo el río Uruguay ya está colonizado por el mejillón.

En Brasil, el Río Grande cuenta con nueve represas, aguas abajo de la represa de Furnas, que fueron colonizadas recientemente por los mejillones. En este río, el primer registro de *L. fortunei* fue en 2011 en la represa Volta Grande (Oliveira y col., 2015).

Hasta el 2014, el mejillón dorado se registró en la Estación Ecológica de Taiama, siendo este el registro más al norte en la Cuenca del Plata. En el 2015, se encontraron mejillones dorados en el río San Francisco, bien al norte de Brasil, a pocos kilómetros de la cuenca del Amazonas (Oliveira y col., 2015).

En la figura 1.4 se presentan los principales cursos de agua de la Cuenca del Plata y se indica el año de la primera aparición del mejillón dorado en cada punto.

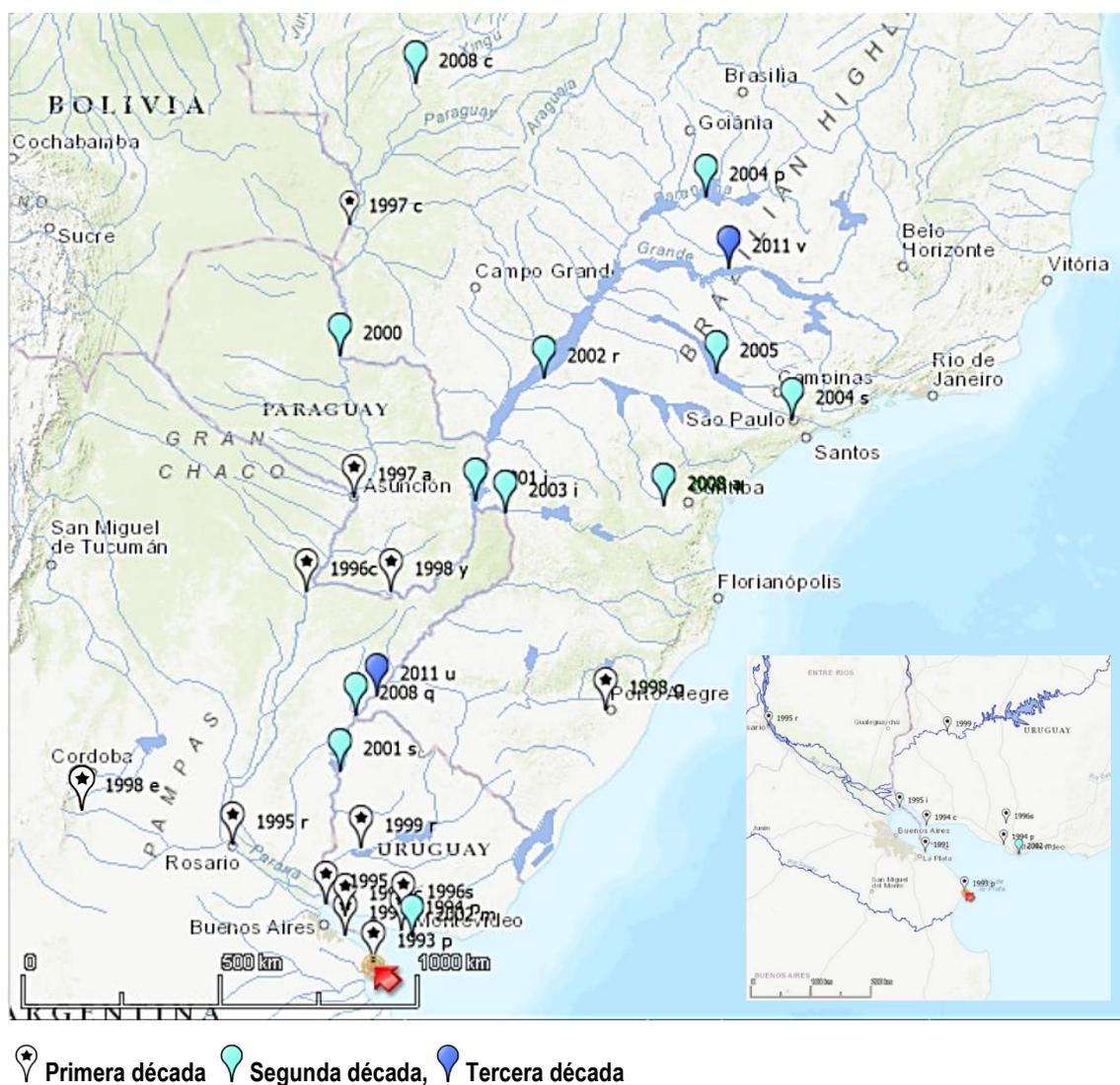


Figura 1.4. Principales cursos de agua de la Cuenca del Plata. Se presenta el año de la primera aparición del mejillón dorado. 1991, Balneario Bagliardi. 1993, Punta Piedras. 1994 c, Colonia. 1994 p, Playa Pascual. 1995 i, Isla Martin García. 1995 r, Rosario. 1996 c, Corrientes. 1996 s, Río Santa Lucía. 1997 a, Asunción. 1997 c, Corumbá (El Pantanal). 1998 e, Embalse Río Tercero* (Fuera de la Cuenca del Plata). 1998 g, Guaíba. 1998 y, Yacretá. 1999 r, Represa Palmar, Río Negro. 2000, Río Apá. 2001 i, Itaipú. 2001 s, Salto grande. 2002 m, Montevideo. 2002 r, Represa Rosana, Río Paranapanema. 2003 i, Río Iguazu. 2004 p, Río Paranaíba. 2004 s, San Pablo. 2005, Barra Bonita, Río Tietê. 2008 a, Porto Amazonas. 2008 c, Cuiabá. 2008 q, Río Quarai. 2011 u, Uruguayana. 2011 v, Volta Grande. Fuente: elaboración propia.

1.3. BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA DEL MEJILLÓN DORADO

La especie *L. fortunei*, es una de las especies de mejillón de agua dulce de la familia Mytilidae, la cual está representada en su mayoría por mejillones que habitan océanos y estuarios (Darrigran y Damborenea, 2006b). El mejillón dorado es originario de China y se ha expandido a otros países asiáticos y a Sudamérica (Figura 1.5).

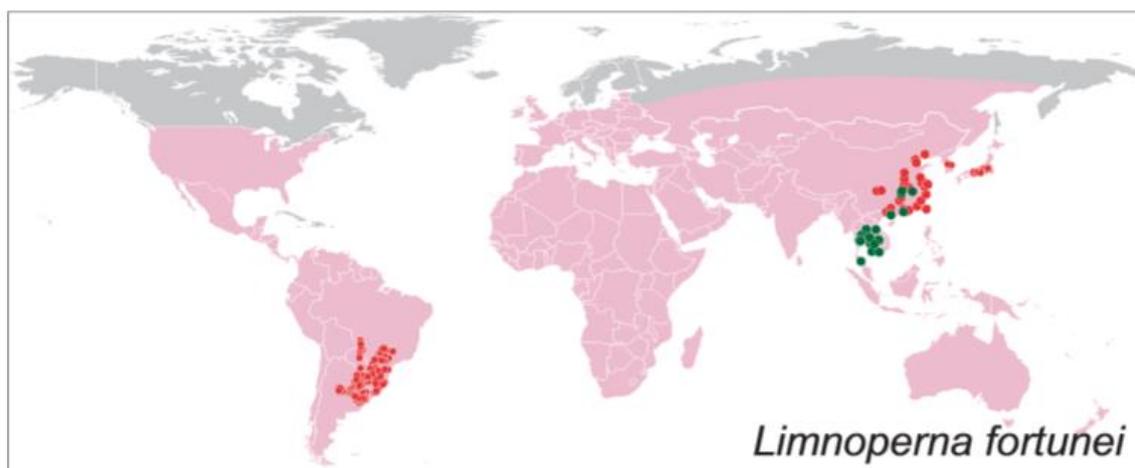


Figura 1.5. Distribución del mejillón dorado. Los puntos en verde muestran los sitios originarios de esta especie, los puntos en rojo muestran los lugares actualmente invadidos, las superficies rosadas muestran los lugares que potencialmente pueden ser invadidos por el mejillón dorado. Fuente: modificado de Karatayev (2015).

Las dos especies de Mytilidae halladas en la Cuenca del Plata, *L. fortunei* y *Mytella charruana*, poseen un modo de vida epifaunal, morfología valvar y forma de vida muy semejantes. Sin embargo, ambas especies se diferencian claramente de los restantes bivalvos de la Cuenca del Plata, que presentan un modo de vida infaunal. *L. fortunei* y *M. charruana*, se diferencian por la capacidad de esta última de tolerar salinidades mayores a 3 ‰ y presentar crenulaciones características en el área charnelar, estructura ausente en *L. fortunei* (Darrigran y Damborenea, 2006b).

Boltovskoy (2015) resalta que la invasión del mejillón dorado en Sudamérica se debe a cinco factores claves: (1) un larva libre nadadora que facilita la dispersión del molusco en el plancton (2) un adulto sésil que se fija a sustratos firmemente a través del biso, lo cual le permite adherirse a navíos generando incrustaciones que pueden ser transportados largas distancias. Los otros tres factores, que permiten la dispersión del mejillón dorado están relacionados con la actividad humana (3) el incremento de la conectividad entre cuencas (4) construcción de embalses y (5) la navegación en aguas continentales.

El impacto ambiental y económico de la especie invasora depende de varios factores, tales como la cantidad de cursos de agua colonizados, la densidad poblacional, la dinámica poblacional y la distribución dentro de un cuerpo de agua. A continuación se presenta un breve resumen sobre la biología y la ecología del mejillón dorado.

1.3.1. Características generales del mejillón dorado: anatomía, biología y ecología

1.3.1.1 Anatomía del mejillón dorado

La anatomía del mejillón dorado es explicada detalladamente en Morton (2015), aquí se presenta de manera simplificada los componentes principales de la anatomía del mejillón dorado para comprender las estructuras comprometidas en el estudio de la movilidad del organismo adulto (el pie), la adhesión (el biso) y la filtración (branquias).

El cuerpo del mejillón dorado está rodeado por el manto, capa delgada de tejido, que segrega la conchilla y se adosa a ésta. El espacio interno encerrado por el manto es la cavidad del manto. A cada lado del cuerpo, entre el manto y el pie, se encuentran las branquias. Las cilias de las branquias generan corrientes que impulsan al agua por el sifón inhalante a la cavidad del manto y branquias. Las partículas sólidas son removidas por las cilias de la branquia. Las partículas alimentarias son dirigidas hacia la boca para su ingestión, mientras que las partículas no alimentarias son envueltas en mucus secretado por las células de la branquia y eliminadas como pseudoheces. La morfología interna básica de *L. fortunei* se detalla en la Figura 1.6

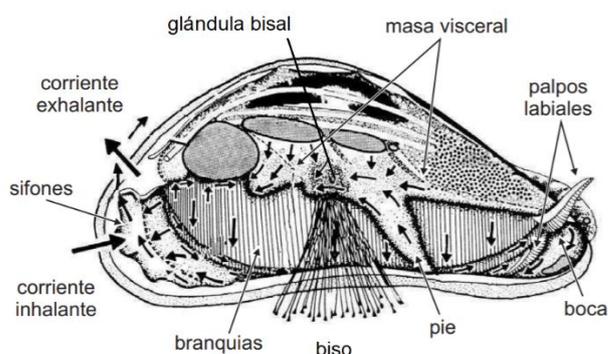


Figura 1.6. Anatomía del aparato filtrador de *L. fortunei*, indicando las corrientes ciliares en las branquias, el pie, la masa visceral y el manto, así como las corrientes inhalante y exhalante. Se retiraron la valva, el manto y la semibranchia derechos. Fuente: Morton (1973).

El pie de *L. fortunei* es aplanado y musculoso, cubierto por cilios sobre toda su extensión (Andrade y col., 2015). En la Figura 1.7 se presenta una ilustración del pie, en la cual se observa el hilo bisal y las placas adhesivas. También se presenta en la misma figura fotografías de microscopía SEM del orificio de la glándula bisal, el hilo bisal y las placas adhesivas.

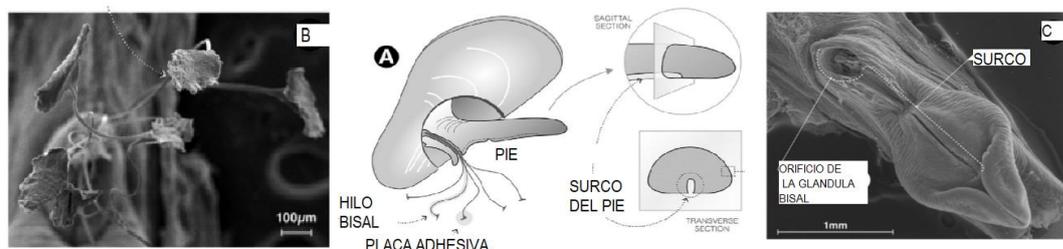


Figura 1.7. (A) Ilustración del pie del mejillón dorado presentando hilos bisales y la placa adhesiva en su extremo (B) hilos bisales y la placa adhesiva mediante microscopía SEM (C) vista panorámica de surco del pie y el orificio de la glándula bisal. Fuente: Andrade y col. (2015).

1.3.1.2 Reproducción y ciclo de vida

El ciclo de vida de *L. fortunei* incluye una fase juvenil-adulta bentónica y una fase larvaria planctónica. Es una especie de sexos separados o gonocórica. Las gónadas se desarrollan tanto en la masa visceral como en el manto. Las gametas femeninas y masculinas son liberadas a la columna de agua donde se produce la fecundación. El ciclo gametogénico está regido por factores ambientales, particularmente la temperatura (Morton, 1982; Darrigran y col., 1999, 2003), de forma tal que el grado de desarrollo gonadal, evacuación gamética y duración del ciclo varían de acuerdo a las condiciones climáticas en las que se encuentran las poblaciones. Los estudios histológicos de la biología reproductiva de *L. fortunei* indican que el desove está relacionado con la temperatura. Se observó que el aumento del desove se desencadena tanto por el incremento como por la disminución de la temperatura (Darrigran y col. 1999, 2003; Giglio y col., 2016).

Diferentes estadios larvales se desarrollan en el plancton (Cataldo y col., 2005; Santos y col., 2005). Los huevos tienen un diámetro de 60-100 μm ; luego de las primeras divisiones se distinguen mórula, blástula y gástrulas, que devienen en larvas trocóforas. Posteriormente se desarrollan las larvas pre-velíger, velíger tipo D, velíger preumbonada, velíger umbonada, pedivelíger y plantígradas (Figuras 1.8 y 1.9). Desde el estadio de prevelíger se observa el desarrollo de dos valvas pequeñas. Las larvas de *L. fortunei* tienen capacidad de ingresar en los sistemas de agua de las industrias, y en sus estadios juveniles y adultos tienen capacidad de asentarse en su interior y provocar macrofouling (Mansur y col., 2012).

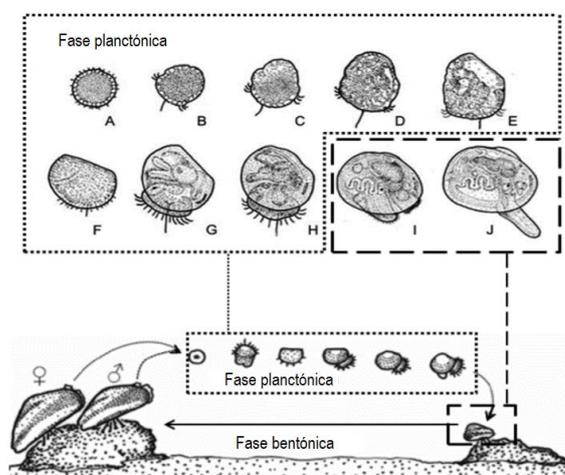


Figura 1.8. Ciclo de vida del mejillón dorado: A) mórula ciliada, B) C) D) E) corresponde a larvas trocóforas en fases I a IV respectivamente (longitudes 80-125 μm); estadios valvados, F) las larvas "D" (100-130 μm), G) velíger con preumbonadas (140-180 μm), H) velíger umbonadas (190-230 μm), I) pedivelíger (230-270 μm) y J), plantígradas (300 μm) bentónicas epifaunal. Fuente: Adaptado de Mansur y col. (2012).

La talla mínima de diferenciación sexual se alcanza a los 3-4 meses de vida con 5 mm de longitud valvar (Darrigran y col., 1999). La longevidad del mejillón dorado es de 2-3 años (Boltovskoy y Cataldo, 1999), y la longitud máxima alcanzada por los individuos es de 40-45 mm (Darrigran, 2002).

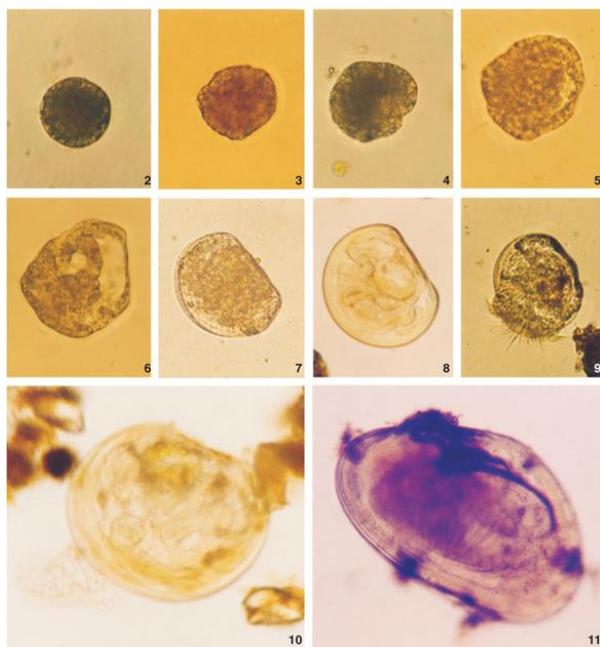


Figura 1.9. Fases larvianas de *L. fortunei*. Playa de Veludo, Porto Alegre, Rio Grande Do Sul. (2) Mórula ciliada, diámetro 80 μm ; (3) larva trocófora fase 1, longitud 100 μm ; (4) larva trocófora fase 2, longitud 110 μm ; (5) larva trocófora fase 3, longitud 125 μm ; (6) larva trocófora fase 4, con primordios de concha, longitud 125 μm ; (7) larva "D", longitud 120 μm ; (8) larva velíger preumbonada, longitud 150 μm ; (9) larva velíger umbonada, longitud 200 μm ; (10) larva pedivelíger, longitud 230 μm ; (11) post-larva en fase de fijación a sustrato duro, longitud 0.75 mm. Fuente: Santos y col. (2005).

1.3.1.3. Mecanismos de dispersión y modo de vida

El mejillón dorado emplea mecanismos naturales y no naturales (aquellos vinculados a la actividad del hombre) para su dispersión, tanto en la etapa larval planctónica como en la juvenil-adulta bentónica. Durante la etapa planctónica ocurre la dispersión natural de los estadios larvales por las corrientes de agua. También la dispersión puede ocurrir por la fijación de formas adultas o juveniles a cualquier tipo de elemento flotante o realizarse probablemente, por zoocoria. Sin embargo, este mecanismo natural de dispersión, no fue el principal utilizado por la especie desde su ingreso en la Cuenca del Plata (Darrigran, 2002), donde la mayor dispersión ocurrió a contracorriente. Este hecho se relaciona a la antropocoria, particularmente debido a la fijación a los cascos de las embarcaciones, lo que queda demostrado al analizar la velocidad diferencial de invasión observada en los diferentes ríos de la mencionada cuenca en relación a la navegabilidad relativa de los mismos. Los ríos Paraná y Paraguay, con alta navegabilidad, fueron rápidamente colonizados, mientras que la invasión en el río Uruguay fue posterior debido a su baja navegabilidad (principalmente deportiva).

Al encontrarse en aguas de flujo relativamente lento, *L. fortunei* se presenta característicamente agrupado y unido al sustrato y entre los individuos de la misma especie a través de su hilo bisal. La especie prefiere las aguas profundas de los cuerpos de agua dulce (Nakano y col., 2010; Brugnoli y col., 2011). *L. fortunei* puede resistir episodios de emersión periódicos breves en el medio ambiente (Iwasaki, 1997) sin embargo, el periodo de emersión puede ser más largo bajo condiciones experimentales (Montalto y Ezcurra de Drago, 2003). Al establecerse, los individuos recién metamorfoseados (larvas pedivelíger y plantígradas) presentan tigmotaxia con preferencia por las grietas anguladas entre las paredes verticales (Morton, 2015). El

asentamiento del mejillón dorado, ocurre preferentemente en sitios ocupados previamente por individuos de su misma especie y la tendencia a agregarse se ve reforzada por este comportamiento (Sardiña y col., 2009). Los individuos juveniles de *L. fortunei* presentan fototaxia negativa, por lo cual generan un movimiento direccionado para alejarse de la fuente luminosa, y geotaxia positiva (generan un movimiento direccionado para descender hacia la tierra) (Morton, 1975; Uryu y col., 1996).

1.3.1.4. Hábitat y condiciones ambientales límites para el mejillón dorado

El mejillón dorado es una especie de agua dulce poco selectiva en cuanto a hábitats. A pesar de haberse descrito su presencia en aguas profundas (Nakano, 2010) también puede vivir en regiones costeras de lagos, lagunas, lagunas y presas, riberas y canales de ríos y arroyos (IBAMA-MMA, 2017). En la fase larval, el mejillón dorado ocupa la columna de agua, integrando el plancton. En esa fase puede alcanzar una densidad de 30,000 ind./m³ (Pereira, 2014), presentando fluctuaciones estacionales. Los mejillones adultos ocupan preferiblemente un sustrato sólido, pero también puede colonizar sustratos no consolidados. Diversos sustratos son citados en literatura: costas y fondos rocosos, macrófitas acuáticas, raíces y ramas de vegetación ribereña (Mansur y col., 2008), conchas de almejas (Mansur y col., 1999; 2003; Santos y col., 2012a y b), conchas de mariscos (Lopes y col., 2009) y caparazones de tortugas (Cardoso, 2014), esta última basada solo en experimentos de laboratorio. En la ausencia de sustratos duros también puede adherirse al limo estabilizado (Correa y col., 2015). Los sustratos artificiales, así como las superficies de los medios de transporte, también están colonizadas por esta especie, entre ellas: barandas, turbinas, pilotes, sistemas de enfriamiento, muros de hormigón, bombas de captación de agua, compuertas de embalses, muelles, botes y embarcaciones (Mansur y col., 2012; Correa y col., 2015).

Las condiciones ambientales límites que afectan la viabilidad del mejillón dorado (Tabla 1.1) permiten predecir los cuerpos de agua factibles de ser invadidos:

La **temperatura** máxima tolerada por el mejillón dorado en ambientes naturales es de 35 °C, mientras que la temperatura mínima ha sido reportada en Sudamérica de 10 °C, en Japón 5-6 °C (Magara y col., 2001), mientras que en Korea se han encontrado en ambientes congelados hasta 2 meses en temperaturas de 0 °C (Choi y Kim, 1985). Por otro lado, Montalto y Marchese (2003) estudiaron el efecto de la temperatura sobre el mejillón dorado en tres rangos de tamaños < 6mm; 6-15, 15-27 mm de longitud valvar. Estos autores encontraron que en condiciones de laboratorio la mortalidad fue de 60% en condiciones de alta temperatura (35°C) y del 20 % a bajas temperaturas (5 °C), luego de 120 horas de tratamiento.

La **salinidad** máxima tolerada por el mejillón dorado en forma continua es de 2 g/l. Sin embargo puede soportar salinidades por encima de 23 g/l, de forma intermitente durante periodos cortos (horas), sin presentar una mortalidad significativa (Sylvester y col., 2013). Esta capacidad le permite tolerar las condiciones de salinidad de un estuario. Según otros autores, el mejillón dorado no tolera salinidades superiores a 3 g/L (Darrigran, 2002; Barbosa y Melo, 2009). Los estudios experimentales revelaron que *L. fortunei* podría vivir solo más de tres semanas con una concentración de sal de 6,8 g/l (Deaton y col., 1989).

Otro factor limitante para el asentamiento del mejillón dorado es la alta concentración de **sedimento en suspensión**. La alta concentración de sedimentos en suspensión (40-60 g/l) evita la invasión de este bivalvo (Darrigran y col., 2011). Oliveira y col. (2011) mencionó que *L. fortunei* puede vivir en un entorno con transparencia de alrededor de 0,1 a 0,4 m (Darrigran y col., 2011)

El mínimo valor de **concentración de calcio** tolerada por el mejillón es de 1 mg/l (Oliveira y col., 2011). Darrigran y col. (2011) no encontraron una concentración máxima de calcio que limite el asentamiento de poblaciones de *L. fortunei*.

El mejillón dorado se ha encontrado en ambientes acuáticos de pH < 6 (Oliveira y col., 2011). Por otro lado, Montalto y Marchese (2003) estudiaron el **efecto del pH** sobre el mejillón dorado en tres rangos de tamaños < 6 mm; 6-15, 15-27 mm de longitud valvar. Estos autores encontraron en condiciones de laboratorio, una mortalidad mayor al 80% en condiciones alcalinas (pH 10), mientras que en condiciones levemente acidas (pH 5) la mortalidad fue menor al 20% luego de 48 horas de tratamiento.

Limnoperna fortunei sobrevive en áreas con **concentraciones de oxígeno** muy bajas, altas cargas orgánicas, contaminación industrial y metales pesados (Villar y col., 1999; Belaich y col., 2006; Boltovskoy y col., 2006; Perepelizin y Boltovskoy, 2011; Bonel y col., 2013; Young y col. 2014). El mínimo valor de oxígeno disuelto tolerado por el mejillón dorado de longitud valvar de 20 mm, en condiciones experimentales a 20 °C es de 0,5 mg/l oxígeno disuelto (Boltovskoy y col., 2006)

1.3.1.6. Alimentación del mejillón dorado por filtración

El mejillón dorado es un filtrador activo que se alimenta de material suspendido como fitoplancton, organismos zooplanctónicos, bacterias y sólidos en suspensión. Su habilidad para la filtración es mucho mayor que para otras especies de bivalvos de agua dulce como *Corbicula fluminea* y especies marinas de Mytilidae y Veneridae, incluso mayor que algunas especies de Dreissena cuando las temperaturas son superiores a 20 °C (Sylvester, 2006). Según este autor, el fitoplancton cumple con el 97% de las demandas básicas de energía de un mejillón de 23 mm de largo basada en información de laboratorio. Fachini y col. (2012) evaluaron la selectividad alimentaria de *L. fortunei* en el laboratorio y encontraron preferencia por las algas espinosas (géneros *Desmosdemus*, *Kirchneriella*, *Monactinus*, *Pediastrum*, *Scenedesmus*, *Staurastrum* y *Tetraedrum*) y filamentosas (géneros *Aulacoseira*, *Mougeotia*, *Planktothryx*). Los experimentos realizados por Frau y col. (2013) revelaron que este molusco prefería las algas con una dimensión lineal máxima de 20 a 100 µm, tales como Desmidiaceae, Chlorococcales, Euglenophyceae y Chrysophyceae. Otros autores evaluaron la preferencia alimenticia del mejillón dorado alimentado con cianobacterias, encontrándose una preferencia del molusco por cepas tóxicas, lo cual indica que podrían presentar una alta resistencia a las cianotoxinas (Gazulha y col.; 2012a, b).

Parámetros del agua	Rango	Autor
pH	pH > 10 (80% de mortalidad)	Montalto y Marchese (2003)
Temperatura	Máxima 35 °C (ambientes naturales)	Montalto y Marchese (2003)
	Mínima 10 °C (Sudamérica)	Montalto y Marchese (2003)
	Mínima 0 °C (Asia)	Magara y col. (2001), Choi and Kim (1985)
Salinidad	Máxima continua 3 g/l	Barbosa y Melo (2009)
	Máxima intermitente 23 g/l	Sylvester y col. (2013)
Sedimento en suspensión	Máxima 40-60 g/l.	Darrigran y col. (2011)
Transparencia	0,1- 0,4 m	Oliveira y col. (2011)
Oxígeno disuelto	Mínimo 0,5 mg/l	Boltovskoy y col. (2006)
Calcio	Mínimo 1 mg/l- Sin máximo.	Oliveira y col. (2011), Darrigran y col. (2011)
Metales pesados	Sin rango	Villar y col. (1999)

Tabla 1.1. Resumen de parámetros del agua que afectan a la viabilidad del mejillón dorado.

1.4. CONTROL Y PREVENCIÓN DEL MEJILLÓN DORADO

Existen diversas estrategias para la prevención y el control del mejillón dorado en las industrias que utilizan agua de ríos invadidos con el bivalvo. Los métodos de control incluyen materiales y revestimientos antiincrustantes, tratamientos químicos, limpieza manual o mecánica, filtración, choque térmico, anoxia e hipoxia, desecación, ozonización, tratamiento ultravioleta, corrientes eléctricas, ultrasonido, manipulaciones de velocidad de flujo, control biológico y varios métodos diversos (Boltovskoy y col., 2015b).

En este trabajo clasificaremos las estrategias de control del mejillón dorado empleados directamente en el agua invadidas con mejillón dorado. Este método es de interés para la industria de tratamiento de agua. Estos métodos podemos clasificarlos en **métodos químicos**, **métodos físicos** (en los que no se adicionan químicos en el agua; Darrigran y Damborenea, 2006a) y **métodos biológicos**.

Entre los **métodos físicos** se encuentran los métodos mecánicos preventivos, que incluyen la utilización de filtros fijos y móviles, sistemas de separación de partículas vórtex y centrípetos. Los métodos físicos también incluyen la remoción manual, remoción mecánica por arenado o lavado con agua a presión, utilización de campos eléctricos, luz ultravioleta y ultrasonido. Entre los **métodos físicos** se encuentran los métodos térmicos, que manipulan la temperatura del agua por inyección de vapor o agua caliente, generando un shock térmico sobre los moluscos que provoca su mortalidad. Otras estrategias para la mitigación del mejillón dorado son la privación del oxígeno y la desecación de los moluscos incrustantes. Todos estos tratamientos se describen extensamente por Boltovskoy y col. (2015b).

Entre los **métodos de control biológico**, se incluyen la cría de peces predadores de los mejillones dorados (Luo, 2006). Este método es amigable con el medioambiente y sostenible cuando se aplica a la entrada de los sistemas de agua, sin embargo su eficacia es limitada.

Existen diversas **estrategias químicas** disponibles para el control de la bioincrustación en los sistemas hidráulicos de las industrias y plantas de tratamiento de agua. Algunas de estas estrategias han sido probadas para el control del mejillón dorado y resultan prometedoras para el uso industrial.

Dentro de las estrategias de control del mejillón dorado utilizando **métodos químicos** se desprenden dos grupos, aquellas que utilizan **compuestos químicos no oxidantes** y aquellas que utilizan compuestos **químicos oxidantes** (Figura 1.10). Las estrategias se dividen en tratamientos **proactivos** y tratamientos **reactivos**. Los tratamientos proactivos evitan el asentamiento de mejillones previniendo el desarrollo de adultos. Los tratamientos reactivos permitirán la remoción de mejillones, eliminando periódicamente los individuos adultos asentados sobre las cañerías.

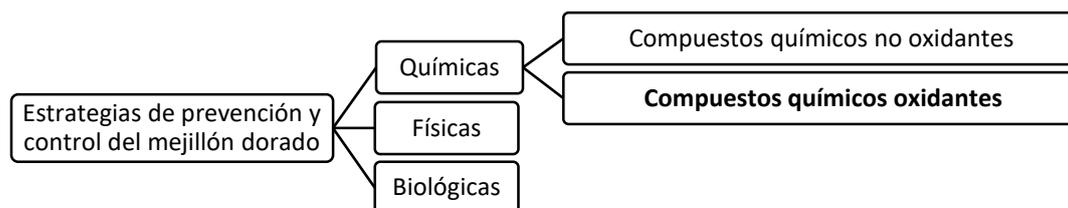


Figura 1.10. Clasificación de estrategias de prevención y control del mejillón dorado desarrollados en este trabajo.

1.4.1 Compuestos químicos no oxidantes evaluados para la prevención y el control del mejillón dorado

La aplicación tecnológica tendiente al control del mejillón dorado basada en el empleo de **compuestos químicos no oxidantes** ha sido descripta extensamente por Claudi y Oliveira (2015). En la Tabla 1.2 se presenta un resumen de los **compuestos químicos no oxidantes** aplicados en la prevención y el control del mejillón dorado. Indicando para cada compuesto la concentración letal 50 (CL50), la concentración con la cual se obtiene la mortalidad del 50% del mejillón dorado adulto en un tiempo determinado. La elección de los productos químicos y el modo de aplicación dependerán de varios factores, tales como viabilidad económica, aprobación regulatoria del producto, protección del medioambiente y preferencia del usuario.

Compuestos químicos no oxidantes		CL50 (mg/l)	Tiempo para CL50 (horas)	Autor
Ajuste de pH*	NaOH	88,51 (pH=11,5)	96	Montresor y col. (2013)
MXD-100*	Taninos, isotiazolona, EDTA, surfactantes catiónicos, glicoles no iónicos	45,9	48	Montresor y col. (2013)
		13,69	72	
		11,1	96	
Clam-Trol/Spectrus CT1300	50% n-alkilo (C12-50%, C14-40%, y C16-10%) de dimetilbencilamonio cloruro	1	192	Boltovskoy y Cataldo (2003)
		2	120	
		5	96	
		10	72	
BULAB 6002	Compuesto de amonio policuaternario catiónico: Poli [oxietileno (dimetiliminio) etileno (dimetiliminio) etileno dicloruro	2	408	Darrigran y Damborenea (2001)
		20 ppm	288	
H-130	Didecil dimetil amonio cloruro	1	96	Boltovskoy y Cataldo (2003)
		2,5	48	
		10	48	
Bayluscide	Dicloro-2' nitro-4' salicilanilida	1-2	48	Cataldo y col. (2003)
Veligon	Poli-dimetil-dialil-amonio cloruro	10	48	Boltovskoy y Cataldo (2003)
Sulfato de cobre	Sulfato de cobre	2,16	48	Soares y col. (2009)
Salinidad	NaCl	8,3 ppt	48	Calazans y col. (2013)
Cloruro de amonio	Nitrógeno amoniacal	0,58	24	Montresor y col. (2013)
		0,35	48	
		0,29	72	
		0,25	96	

Tabla 1.2. Compuestos químicos no oxidantes para el tratamiento del mejillón dorado. *Método proactivo.

La adición de productos químicos se implementa rápidamente con un costo económico generalmente modesto. Sin embargo, en Norteamérica y Europa, las estrategias de control del mejillón dorado, son cada vez más difíciles de efectuar debido a los estrictos límites regulatorios sobre la presencia de productos químicos en el agua (Claudi y Oliveira, 2015). En Brasil, el único producto habilitado para su uso en el tratamiento del mejillón dorado, es MXD-100 dentro de los productos listados en la Tabla 1.2. Este producto fue aprobado en el año 2015, mediante un

registro de emergencia, por el Instituto Brasileño de Medio Ambiente y de Recursos Naturales Renovables (IBAMA), solo para ser utilizado en sistemas de enfriamiento de centrales hidroeléctricas, con el objetivo de crear un microambiente inadecuado para la fijación de las larvas de mejillón dorado.

1.4.2. Compuestos químicos oxidantes evaluados para la prevención y el control del mejillón dorado

Existen diferentes compuestos químicos oxidantes empleados en la prevención y el control del mejillón dorado: cloro, dióxido de cloro, ozono, permanganato de potasio, peróxido de hidrógeno, dicloroisocianurato de sodio. A continuación se describe la bibliografía que existe respecto de estos oxidantes en su acción molusquicida sobre mejillón dorado.

1.4.2.1. Cloración para el control del mejillón dorado

Zhuang (2006) ha ensayado el **cloro** como tratamiento de control del mejillón dorado en su fase adulta (15-20 mm de longitud valvar). El autor indica que las concentraciones más rentables económicamente se encuentran en el rango de 2-3 mg/l de cloro. En la Figura 1.11 se observa que a esas concentraciones, se obtiene el 100 % de mortalidad con un tiempo de contacto de 8,5 y 6,5 horas respectivamente.

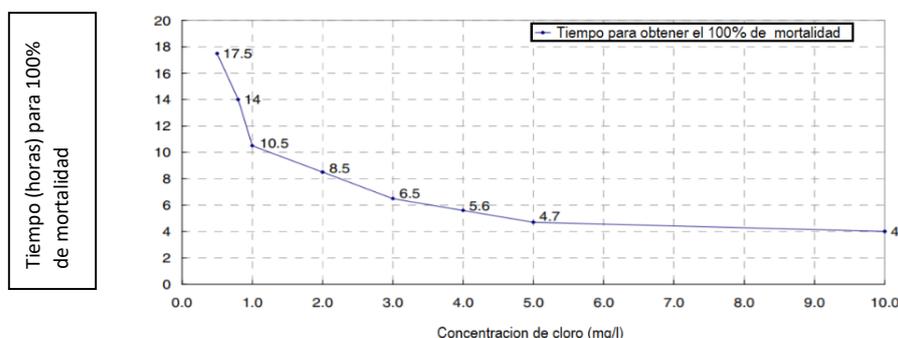


Figura 1.11. Relación entre el tiempo (expresado en horas) requerido para obtener el 100% de mortalidad del mejillón dorado adulto (longitud valvar 15-20 mm) frente a la concentración de cloro. Fuente: Zhuang (2006).

Por otra parte, Morton y col. (1976) estudiaron la cloración como tratamiento de control del mejillón dorado adulto bajo flujo continuo, los resultados muestran que el tiempo requerido para obtener el CL50 es inversamente proporcional a la concentración de hipoclorito de sodio en el agua (Figura 1.12). Para una dosis de 0,8 y 1 mg/l de hipoclorito de sodio se requieren 23 y 15,3 días de contacto para obtener la mortalidad del 50 % de la población.

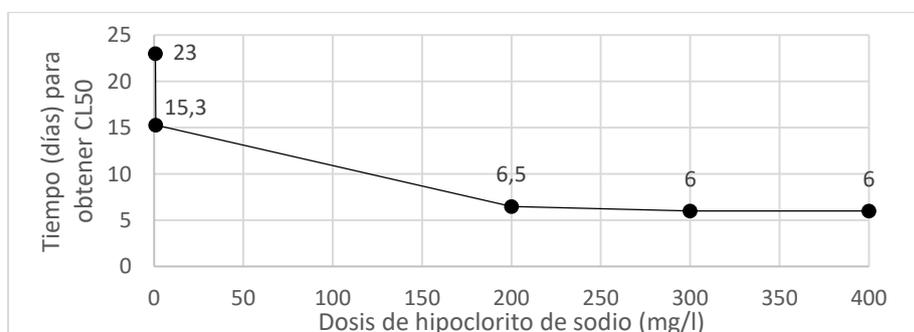


Figura 1.12. Relación entre el tiempo requerido para obtener CL50 frente a la concentración de hipoclorito de sodio. Fuente: Morton y col. (1976).

Si comparamos los trabajos de Zhuang (2006) y Morton (1976) a fin de establecer una dosis de referencia de cloro para el tratamiento del mejillón dorado, observamos que, si bien en ambos casos utilizan mejillones dorados adultos, en un caso se expresa el activo como cloro y en otro caso como hipoclorito de sodio. Siendo que ambas son especies químicamente relacionadas pero diferentes, deberían expresarse en función de su principio activo. Tampoco se indica si se realizó un ensayo estático o con flujo continuo. No se detalla la temperatura del ensayo ni la calidad del agua utilizada.

Un estudio más detallado fue realizado por Cataldo y col. (2003) donde se presentan claramente los parámetros del ensayo (tamaño del mejillón dorado, temperatura del ensayo, calidad del agua, etc.). En su estudio se evaluó la acción del cloro como molusquicida y se expresó como **cloro libre**. Se determinó que para alcanzar el valor de Dosis Letal 50 (LD 50, la dosis, que provoca la muerte del 50% de un grupo de animales de prueba) se necesita un tiempo de contacto de 25 días con dosis de 93 mg/l de cloro a 15°C, entre 20 y 25 días con dosis de 1-3 mg/l de cloro a 20 ° C, y 10 días con dosis de 5,5 mg/l de cloro a 25°C. Los autores afirman que han hallado resultados concordantes con el estudio de Morton (1976).

Si comparamos ambos trabajos (Morton, 1976; y Cataldo y col., 2003), a igual temperatura (aproximadamente 20 °C), a una dosis de 1 mg/l de cloro libre y 1 mg/l de hipoclorito de sodio, se observa que el tiempo de contacto para alcanzar una mortalidad del 50 % es mayor que para alcanzar una mortalidad del 100 %. El tiempo para alcanzar el 100% de mortalidad fue de 15,3 días con hipoclorito de sodio mientras que el tiempo para alcanzar el 50% de mortalidad fue de 25 días con cloro libre. Si se considera además, que el cloro libre no es equivalente al hipoclorito de sodio, el tiempo para alcanzar el 100% de mortalidad debería ser aún mayor.

Si comparamos los trabajos de Zhuang (2006) y Cataldo y col. (2003), podemos observar que se alcanza una mortalidad del 100% del mejillón dorado con una dosis entre 0,5 mg/l de cloro en un tiempo de contacto < 1 día, según Zhuang (2006). Mientras que la mortalidad del 50% se alcanza con una dosis entre 1 mg/l de cloro en un periodo entre 25 días según Cataldo y col., (2003), ambos estudios realizados con mejillones adultos (15-25 mmm de longitud valvar). Estos datos resultan extremadamente diferentes entre sí y resulta de interés su revisión.

En la Tabla 1.3 se presenta un resumen de resultados encontrados para la mortalidad del mejillón dorado adulto para tratamientos con hipoclorito de sodio y cloro.

Producto	Dosis (mg/l)	Tiempo (días)	Mortalidad %	T (°C)	Estadio (long. valvar mm)	Autor
Hipoclorito de sodio	0,8	23	100	20 (aprox.)	Adultos	Morton y col. (1976)
Hipoclorito de sodio	1	15,3	100	20 (aprox.)	Adultos	Morton y col. (1976)
Hipoclorito de sodio	200, 300 y 400	6,5-6	100	20 (aprox.)	Adultos	Morton y col. (1976)
Hipoclorito de sodio	663,6	2	50	25	Adultos (15-25)	Calazans y col. (2013)
Hipoclorito de sodio	0,5	1	< 5	24-25	Adultos (6-43)	Boltovskoy y col. (2005)
Hipoclorito de sodio	0,5	2	< 5	24-25	Adultos (6-43)	Boltovskoy y col. (2005)
Hipoclorito de sodio	0,5	3	< 5	24-25	Adultos (6-43)	Boltovskoy y col. (2005)
Cloro libre	93	25	50	15	Adultos (15-25)	Cataldo y col. (2003).
Cloro libre	1	25	50	20	Adultos (15-25)	Cataldo y col. (2003).
Cloro libre	3	20	50	20	Adultos (15-25)	Cataldo y col. (2003).
Cloro libre	5,5	10	50	25	Adultos (15-25)	Cataldo y col. (2003).
Cloro	0,5- 10	< 1	100	No indica	Adultos (15-20)	Zhuang (2006)

Tabla 1.3. Resumen de resultados encontrados para la mortalidad del mejillón dorado para tratamientos con hipoclorito de sodio y cloro.

Los resultados encontrados en bibliografía sobre la aplicación de cloro como tratamiento para el mejillón dorado han resultado variables.

1.4.2.2. Dióxido de cloro para el control del mejillón dorado

Calazans y col. (2013), han obtenido que el tratamiento de mejillones dorados adultos (15-25 mm de longitud valvar), a una temperatura de 25 °C y condiciones estáticas, alcanza una CL50 a 48 horas contacto para **dióxido de cloro** con 427,6 mg/l; mientras que para el **hipoclorito de sodio** fue con 663,6 mg/l. El dióxido de cloro es efectivo contra muchos microorganismos y más potente que el cloro en un tiempo de contacto corto. El dióxido de cloro presenta mayor poder de oxidación, lo que contribuye a la remoción de olor, color y mal sabor. Asimismo, reduce/limita la formación de trihalometanos. Sin embargo el dióxido de cloro es más caro que el cloro. Otra desventaja es que produce subproductos en forma de cloritos y cloratos. Los cloritos y cloratos oxidan la hemoglobina y el clorito es un agente hemolítico (Anderson y col., 1982). Otra desventaja, es que se requiere de un equipamiento específico para ser generado en el sitio donde será dosificado.

1.4.2.3. Ozonización para el control del mejillón dorado

El ozono es un oxidante extremadamente fuerte que se ha utilizado en Europa por muchos años como desinfectante de agua potable (Van Benschoten y col., 1993). El ozono mejora el color, el olor y el sabor del agua potable y puede usarse para evitar la bioincrustación (Mackie y Claudi, 2010). El control del mejillón dorado por ozonización fue evaluada por Xu y col. (2009). Se estudiaron dos tamaños de mejillón dorado con longitudes valvares < 15 mm y > 15 mm, los

mejillones dorados fueron dispuestos en vasos sobre los cuales se aplicó 2-3 mg/minuto de ozono, utilizando 30 mejillones en cada ensayo. La mortalidad de los mejillones dorados aumentó con el tiempo. Para alcanzar 100% de mortalidad, se requieren 8 y 12 días para los tamaños < 15 mm y > 15 mm respectivamente. Sin embargo debido a su alta reactividad y rápido consumo por parte de los organismos presentes en los ríos, el ozono requiere ser inyectado constantemente para retener los efectos a largo plazo; por lo tanto, la ozonización no es un tratamiento rentable para uso a largo plazo en sistemas de transferencia de agua. Otra desventaja de usar ozono es el alto costo inicial del equipo y las dificultades de mantenimiento (Mackie y Claudi, 2010).

1.4.2.4. Permanganato de potasio para el control del mejillón dorado

Cepero (2003), trabajó en la ciudad de Santa Fe (Argentina), en su ensayo dispuso bioboxes por los cuales circuló un flujo continuo de agua cruda (110 l/h). Se utilizaron dosis de 1 mg/l de cloro y 1 mg/l de permanganato de potasio y se dispuso un biobox sin producto oxidante como control. A los 30, 60 y 90 días de experimento, los bioboxes tratados no presentaron incrustaciones de mejillón dorado mientras que en el control se observó presencia de mejillones a los 30 días, que se incrementó en número y en tamaño a los 60 y 90 días. Por su parte, el trabajo de Liu y col. (2012), realizado en Asia, muestra que la concentración de permanganato de potasio entre 1,2-1,8 mg/l podría utilizarse para matar a *L. fortunei* en tiempos cortos a un bajo costo y este efecto se incrementa con la temperatura. El permanganato de potasio es un oxidante fuerte con un largo historial de uso seguro en agua potable, aguas residuales y en industrias manufactureras de productos químicos. Ha sido utilizado por plantas de tratamiento de agua como un oxidante desde principios del siglo XX, y se utiliza comúnmente en instalaciones municipales para la depuración del agua. Es fácil de aplicar en cuanto a las instalaciones y equipamiento requeridos. El permanganato de potasio es utilizado en plantas de tratamiento de agua principalmente para la remoción de olores y sabores, eliminación de hierro y manganeso (Mackie y Claudi, 2010). A diferencia del cloro, el permanganato de potasio no produce trihalometanos, pero puede dar al agua un color rosado si se dosifica en exceso (San Giacomo y Wymer, 1997). Las principales desventajas son que es un producto caro en relación al cloro y es un desinfectante poco efectivo que requiere largos tiempos de contacto (Ramírez Quirós, 2005).

1.4.2.5. Peróxido de hidrógeno para el control del mejillón dorado

Liu y col. (2006) realizaron estudios para evaluar la aplicación de **peróxido de hidrógeno** como tratamiento de control del mejillón dorado adulto, emplearon 30 ejemplares de 15-20 mm de longitud valvar por dosis. En este experimento se obtuvo 100% de mortalidad a las dosis de 0,2; 1,2; 1,8 y 60 g/l de peróxido de hidrógeno a los tiempos de contacto de 6,5; 5,9; 5,0 días y 6,5 horas respectivamente. Según la autora las concentraciones de 1,2–1,8 g/l de peróxido de hidrógeno son efectivas y económicamente viables en secciones restringidas de canales cerrados sellados, sin embargo en tuberías largas, las concentraciones letales son difíciles de mantener Xu y col. (2009).

1.4.2.6. Dicloroisocianurato de sodio para el control del mejillón dorado

Este compuesto se utiliza principalmente como desinfectante, biocida, desodorante industrial y detergente. El dicloroisocianurato de sodio se encuentra en los sistemas de purificación de agua, como pastillas y en los filtros. En estas aplicaciones, es una fuente de liberación lenta de cloro en bajas concentraciones a tasa relativamente constante. Se ha probado con éxito el uso de dicloroisocianurato de sodio como una fuente alternativa de cloro para el control del mejillón

dorado. Su almacenamiento más fácil y no genera trihalometanos. Una desventaja del producto, es que al ser efervescente forma microburbujas que pueden impactar negativamente en el rendimiento de las bombas en los sistemas de agua. La estrategia de prevención y control del mejillón dorado es mantener 1,5 mg/l de cloro residual en el sistema hidráulico durante 2 horas, durante la temporada de reproducción y reducir la dosis a 0,5 mg/l de cloro residual durante 2 horas en invierno (Claudi y Oliveira, 2015).

En la Tabla 1.4 se presentan las ventajas y desventajas de los productos oxidantes utilizados para la prevención y el control del mejillón dorado.

Producto	Ventajas	Desventajas
Cloro (Hipoclorito de sodio)	Es el método más utilizado y conocido. Es muy efectivo como biocida. Es económico. Fácil aplicación.	Forma subproductos halogenados. El cloro gas es peligroso y corrosivo. En el caso de emplear uno de sus principales derivados como es el hipoclorito sódico, este se degrada en el tiempo y al estar sometido a la luz. Es menos efectivo a pH alto
Dióxido de cloro	No genera subproductos halogenados (si está bien generado). Es más efectivo que el cloro y las cloraminas para inactivación de virus y parásitos. Su efectividad está poco influenciada por el pH.	Forma subproductos como cloritos y cloratos. El gas es explosivo en una concentración del 10% en el aire. La generación no apropiada, como exceso de cloro, puede formar subproductos halogenados. Tiene que ser generado <i>in situ</i> . Es más costoso que el cloro
Ozono	Es más efectivo que el dióxido de cloro y cloraminas en la inactivación de virus y parásitos. No forma subproductos halogenados, a no ser que haya presencia de bromuros. Requiere una concentración y tiempo de contacto menor para su labor de desinfección. Su efectividad no está influenciada por el pH.	Puede producir subproductos, como bromatos, aldehídos y ácidos. Requiere gran cantidad de energía en su generación, así como equipos más costosos. Es muy corrosivo y tóxico. Puede formar óxido nítrico y ácido nítrico que causaran corrosiones en los equipos. Desaparece con rapidez del agua, especialmente a altos pH y temperatura. Tiene que ser generado <i>in situ</i> . Es más costoso que el cloro
Permanganato de potasio	Oxida y elimina a materias orgánicas precursoras de subproductos. Es fácil de aplicar en cuanto a las instalaciones requeridas. No forma los subproductos de los demás oxidantes.	Puede teñir el agua de un ligero color rosado si se dosifica en exceso. Requiere largo tiempo de contacto. Es tóxico e irritante de la piel. No es un gran desinfectante Es más costoso que el cloro
Peróxido de hidrogeno	Reacciona y se descompone en agua y oxígeno, sin producir ningún efecto nocivo en el medioambiente. Tasayco Chiroque (2011)	Requiere largo tiempo de contacto. No es un gran desinfectante. Es menos efectivo a pH alto. Es más costoso que el cloro.
Dicloroisocianurato de sodio	Fácil almacenamiento. No genera trihalometanos.	Forma microburbujas que perjudican el desempeño de bombas.

Tabla 1.4. Ventajas y desventajas de los productos oxidantes utilizados para la prevención y el control del mejillón dorado. Fuente: modificado de Ramírez Quirós, 2005.

1.4.2.7. Compuestos oxidantes utilizados en los sistemas hidráulicos de las industrias para la prevención y el control del mejillón dorado

Existen numerosas experiencias con compuestos oxidantes para la prevención y control del mejillón dorado en los sistemas hidráulicos de las industrias. En la Tabla 1.5 se presentan estudios realizados bajo aplicación continua de cloro, dióxido de cloro, ozono y permanganato de potasio respectivamente. Se observa que la dosis de aplicación continua se para estos oxidantes varia 0,15-1 mg/l.

Compuestos químicos oxidantes		Dosis (mg/l)	Autor
Cloro	Aplicación continua en tratamiento de agua en Hong Kong	0,5	Morton (1976)
Cloro	Aplicación continua en tratamiento de agua en Santa Fe	1	Cepero (2003)
Dióxido de cloro	Aplicación continua planta de tratamiento municipal al sur de Brasil	0,8	Nalco (2013)
Ozono	Aplicación continua en la planta hidroeléctrica de ITAIPU	0,15-0,20	Claudi y Oliveira (2015)
Permanganato de potasio	Aplicación continua en Santa Fe (Argentina)	1	Cepero (2003)

Tabla 1.5. Compuestos oxidantes para la prevención de la adhesión del mejillón dorado.

1.5. CARACTERÍSTICAS DEL CLORO Y EL ÁCIDO PERACÉTICO COMO BIOCIDA IDEAL

Según la definición de Maroñas y Damborenea (2006), el **biocida ideal** es:

- una sustancia altamente tóxica para un tipo particular de organismo o grupo de organismos y
- que no tiene efectos perjudiciales para el resto de los componentes biológicos del sistema.
- este compuesto ideal no reacciona con los elementos abióticos del ambiente y
- se disocia en formas no tóxicas.

Como se sabe, este biocida ideal aún no se ha logrado, pero ante la necesidad de ser utilizado en la prevención del asentamiento y/o en el control efectivo del biofouling en sistemas de aguas, las investigaciones se han orientado en el sentido de minimizar los impactos ambientales.

A continuación se describirá la química del cloro y del ácido peracético, el efecto biocida de estos productos, las reacciones de estos oxidantes con las sustancias presentes en el agua y los subproductos de descomposición.

1.5.1. Características del cloro

El cloro ha sido aplicado ampliamente en los tratamientos de potabilización del agua para el consumo humano. Recientemente, la cloración con hipoclorito de sodio comenzó a utilizarse en forma muy extendida en los sistemas de agua como método para el control del biofouling (Maroñas y Damborenea, 2006). De todos los desinfectantes es el más intensamente estudiado en relación con su química, toxicidad y ecotoxicidad. Por ello, al estar tecnológicamente bien probado y porque su costo económico es aceptable, es utilizado universalmente en las industrias. Sin embargo, está muy lejos de poseer las características del biocida ideal (Maroñas y Damborenea, 2006). Debido a que el poder biocida de las diferentes especies del cloro es muy variable, se debe comprender con profundidad la química de la cloración.

Las reacciones que tienen lugar entre el cloro y el agua, aunque en principio parecen muy simples, no siempre lo son, ya que el agua objeto de la cloración no sólo es H₂O, sino que en ella hay diversas sales y materias orgánicas en solución y suspensión (Spellman, 2014).

La desinfección con cloro puede realizarse con cloro gas, hipoclorito de sodio o hipoclorito de calcio. El cloro gas se hidroliza rápidamente en agua para formar ácido hipocloroso (HOCl). El ácido hipocloroso es un ácido débil ($pK_a = 7,5$), lo que significa que se disocia moderadamente pero en cantidad suficiente para disminuir el pH del agua debido a la producción del ión hidronio. Entre un pH de 6,5 y 8,5 la disociación del ácido hipocloroso es incompleta y coexiste con el OCl⁻. La disociación no se produce a valores de pH menores de 6,5 mientras que por arriba de 8,5 es completa. Debe tenerse en cuenta que el ácido hipocloroso tiene mayor poder oxidante y bactericida que el ión hipoclorito, debiendo operarse al pH más idóneo para lograr una más eficiente desinfección (Tchobanoglous y col., 2012).

Durante el proceso químico de la desinfección, se producen compuestos tales como cloraminas, dicloraminas y tricloraminas en presencia de amoníaco en el agua. Las cloraminas sirven igualmente como desinfectantes aunque reaccionen de una manera sumamente lenta (Tchobanoglous y col., 2012).

El cloro es un agente químico tan activo que también se combina con muchas de las sustancias disueltas o suspendidas en agua, por ejemplo, con la materia orgánica, ácido sulfhídrico, manganeso, hierro y nitritos. En conjunto, estas sustancias se denominan compuestos reductores y su cantidad varía en cada agua, dependiendo del tipo de fuente (superficial, subterránea o descargas), la naturaleza del compuesto que contenga el agua o la época del año. Por ello, al entrar en contacto el cloro con el agua, una cantidad es consumida por los compuestos reductores que lo convierten en cloruros cuando son inorgánicos, organoclorados si son orgánicos o cloraminas si contiene derivados del amonio, inhabilitándolo para la desinfección (Tchobanoglous y col., 2012).

Existen otros compuestos que se generan durante la desinfección del agua (subproductos de la desinfección) debido a la reacción del cloro con la materia orgánica presente en el agua: los trihalometanos (THM). La cantidad y proporción de THM en el agua dependerá de la cantidad de cloro añadido, cantidad de materia orgánica, y concentración de bromuros del agua, pH y temperatura. Los THM que se encuentran en el agua de consumo humano son el cloroformo, el bromodiclorometano, el dibromoclorometano y el bromoformo (Serveis de Vigilància Ambiental Qualitat i Intervenció Ambiental, 2014).

La composición oxidable del agua se estima en la demanda de cloro (CONAGUA, 2015). La demanda de cloro es la diferencia entre la dosis de cloro añadida y el contenido de cloro residual, al cabo de un tiempo de contacto, suficiente para completar las reacciones de oxidación mencionadas anteriormente. La demanda de cloro es una función de la temperatura, concentración y tiempo, su determinación debe tomar en cuenta cada uno de estos tres factores.

En la Tabla 1.6 se presentan los parámetros del agua que pueden afectar la cloración:

Parámetro del agua	Efecto sobre la cloración
pH	pH > 7,6 disminuye la eficiencia desinfectante
Fe ⁺² , Mn ⁺² , NO ₂ ⁻ , y H ₂ S	Genera demanda de cloro
NH ₃	Genera cloraminas y demanda de cloro
Materia orgánica	Genera THM y demanda de cloro
Bromo y materia orgánica	Genera THM y demanda de cloro
Temperatura	La eficacia de desinfección en cloración del agua aumenta al incrementar la temperatura. A pesar de esto, ocurre que como en el agua a baja temperatura el cloro permanece más tiempo, puede llegar a compensarse la mayor lentitud de la desinfección con la mayor duración del cloro en el agua.

Tabla 1.6. Parámetros del agua que afectan la cloración. Fuente: Tchobanoglous y col. (2012).

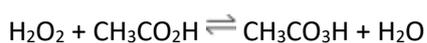
1.5.2. Características del ácido peracético

Debido a los posibles riesgos mutagénicos/cancerígenos de los THM, asociados con el consumo de agua potable (Hernández Sánchez y col., 2011), se han evaluado alternativas desinfectantes en el tratamiento del agua, siendo el **ácido peracético** un producto químico oxidante útil para este fin.

1.5.2.1. Propiedades químicas del ácido peracético

El ácido peracético (APA, CH₃CO₃H) o ácido peroxiacético pertenece a la familia de compuestos peroxigenados (R-O-O-R). El APA es un peróxido orgánico y, como tal, es un fuerte agente oxidante. En relación a sus propiedades físicas y químicas, el APA es un líquido transparente, incoloro, corrosivo, con un olor acre fuerte, penetrante y similar al ácido acético. El producto no tiene capacidad de formación de espumas (Sol Sánchez y col., 2020).

Las soluciones de APA usadas como sanitizantes, son elaboradas normalmente por la mezcla de dos sustancias: ácido acético y peróxido de hidrogeno, cuyo producto es una mezcla de tres sustancias en equilibrio: ácido peracético, ácido acético y peróxido de hidrógeno.



El APA está disponible comercialmente en concentraciones de 5 - 40 % p/p, en una mezcla de equilibrio con ácido acético (CH₃COOH), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y agua (Kitis, 2004). Dado que los peróxidos son muy inestables, para evitar una reacción inversa, las soluciones comerciales de APA están enriquecidas con CH₃COOH y H₂O₂ (Figura 1.13).

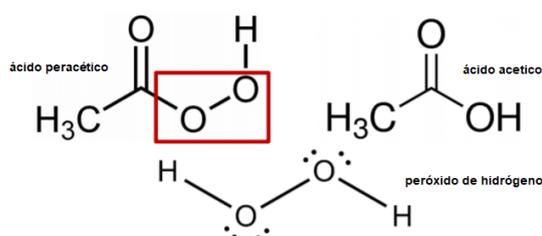


Figura 1.13. Componentes químicos de la solución en equilibrio de ácido peracético

El APA es un oxidante fuerte con un elevado potencial estándar de oxidación (1,81 V, Tabla 1.7) y un alto contenido de oxígeno reactivo (21,1%), lo que hace que este compuesto tenga especial importancia en diversos sectores. El APA se ha utilizado ampliamente como desinfectante en diversas industrias (Malchesky, 2008), como el procesamiento de alimentos, bebidas, cervecería, farmacéutica, pulpa y papel, así como aplicaciones médicas, sistemas de enfriamiento de agua y proceso de agua entre otros (Block, 2001; European Chemicals Agency, 2015).

Agente oxidante	Potencial de oxidación (V)
Flúor	3,06
Ozono	2,07
Ácido Peracético	1,81
Peróxido de hidrógeno	1,77
Iones de permanganato	1,55
Acido hipocloroso	1,49
Cloro	1,36
Dióxido de cloro	1,27

Tabla 1.7. Potencial de oxidación de diferentes agentes y especies químicas. Fuente: Tchobanoglous y col. (2012).

1.5.2.2. Propiedades del ácido peracético como biocida

El APA ha mostrado poseer un amplio espectro de ataque a microorganismos tales como virus, bacterias, hongos, levaduras, y un amplio poder esporicida, incluso a bajas temperaturas (Falsanisi y col., 2006; Kitis, 2004; Rutala y Weber, 1999). La eficiencia de desinfección del APA hacia los microorganismos puede ser clasificada de la siguiente manera: Bacterias > Virus > Esporas Bacterianas > Protozoarios (Rudd y Hopkinson, 1989; Liberti y col., 1999). Su actividad desinfectante está basada en la liberación de especies reactivas del oxígeno (Liberti y col., 1999). El mecanismo principal de acción del APA consiste en atravesar la membrana citoplasmática de la célula, oxidando los componentes y destruyendo el sistema enzimático, permitiendo además, el paso del peróxido de hidrógeno a través de la membrana celular e inhibiendo la enzima catalasa (Kitis, 2004).

Si bien, el APA es tóxico para organismos pequeños como bacterias, algas, crustáceos planctónicos y embriones de bivalvos y moluscos (Butler 1987, Fairhurst 1987; Domínguez Henao y col., 2018) no tiene efectos tóxicos agudos para los organismos acuáticos de mayor tamaño (Hurtado y col., 2021).

Se ha estudiado del APA **como molusquicida** sobre *Dreissena polymorpha* (**mejillón cebra**):

Por un lado, Verween y col. (2009) evaluaron la toxicidad del APA (Degaclean 150 de la compañía Evonyk) sobre larvas prevelígeras del mejillón cebra, a una temperatura de 20 °C y mostraron un 95 % de mortalidad con 3 mg/l durante 15 minutos de exposición. Vegega y Manissero (1996) evaluaron la mortalidad de mejillón cebra bajo el tratamiento con APA en condiciones de flujo continuo. Logro el obtener el 100% de la mortalidad con dosis de 0,24-1,1 mg/l de APA luego de 9 y 7 días respectivamente.

Más recientemente, se ha estudiado del APA como molusquicida sobre *Dreissena bugensis* (**mejillón quagga**):

Hurtado y col. (2021), aplicaron APA en el agua cruda para el control del mejillón quagga en un sistema estanco y en un sistema con flujo. En la Tabla 1.8 se resumen los resultados encontrados:

Sistema estanco (temperatura 8-19 °C)			Sistema con flujo (temperatura 3-5 °C)		
Dosis (mg/l)	Mortalidad %	Tiempo (días)	Dosis (mg/l)	Mortalidad %	Tiempo (días)
5	20	30	5	50	16
10	30	30	5	75	25
25	50	18	10	100	21
50	90	4	25	100	15

Tabla 1.8. Mortalidad del mejillón quagga bajo tratamientos con APA. Fuente: Hurtado y col. 2021.

Se ha realizado una extensa revisión en bibliografía y actualmente no existen estudios del efecto del ácido peracético como molusquicida sobre *L. fortunei*.

1.5.2.3. Subproductos de la desinfección con ácido peracético

La desinfección con APA presenta un gran beneficio adicional: no produce subproductos de desinfección o lo hace en muy baja cantidad (Koivunen y Heinonen-Tanski, 2005; Monarca y col., 2002), por tal motivo se lo reconoce como “amigable para el ambiente”. Además los residuos del desinfectante se descomponen rápidamente en compuestos inocuos tales como ácido acético y oxígeno.

En relación a su ecotoxicidad, Bolognesi y col. (2004) investigaron la influencia de los desinfectantes clásicos como el hipoclorito de sodio y el dióxido de cloro, así como **ácido peracético (APA)**, en la formación de mutágenos en aguas superficiales utilizadas para consumo humano. Para ello, realizó pruebas de genotoxicidad *in vivo* (ensayo Cometa y micronúcleos) en una planta piloto experimental. En dicho trabajo los autores expusieron al molusco *Dreissena polymorpha* (mejillón cebra), en cuencas experimentales abastecidas con agua del lago en presencia y ausencia de los diferentes desinfectantes (y sus subproductos de desinfección). Los efectos se detectaron en diferentes tejidos: hemocitos para el ensayo Cometa y branquias para el Prueba de micronúcleos. Los resultados mostraron diferencias en los niveles basales de migración de ADN y frecuencia de micronúcleos, con los dos compuestos clorados (hipoclorito de sodio y dióxido de cloro) se observó la interacción entre el ADN y el subproducto de desinfección. Por su parte, el ácido peracético no indujo efectos clastogénicos / aneugénicos ni daño al ADN en este bioindicador. Este estudio propone al ácido peracético como una alternativa en la desinfección en el proceso de potabilización del agua.

1.5.2.4. Reacciones del APA en solución acuosa

La efectividad del APA como biocida, dependerá de su concentración en el medio acuoso. Por lo tanto, su descomposición y el consumo de APA al oxidar otros compuestos presentes en el agua tratada, tendrán como consecuencia una menor efectividad del biocida.

Algunos de los factores que afectan la **velocidad de descomposición** del APA son la concentración inicial dosificada, el pH, la presencia de material orgánico, sólidos en suspensión, iones de metales de transición, salinidad y dureza del agua (Sanchez-Ruiz y col., 1995; Yuan y col., 1997b; Lazarova y col., 1998; Falsanisi y col., 2006; Pedersen y col., 2009; Howarth y Harvey, 2010; Liu y col., 2014).

El APA es un ácido débil ($pK_a = 8,2$), a valores de **pH** más altos que este valor, el equilibrio se desplaza hacia la forma disociada ($CH_3CO_3^-$). El rendimiento de la desinfección del APA es más eficaz en condiciones ácidas y por encima de pH 9 la eficiencia comienza a disminuir (Kitis, 2004; Luukkonen y col., 2014).

Varios autores han informado que los **metales de transición** catalizan la descomposición del APA (Yuan y col., 1997a y b; Wagner y col., 2002; Kitis, 2004; Zhao y col., 2008; Pedersen y col., 2013;

Luukkonen y col., 2014; Luukkonen y Pehkonen, 2016). Yuan y col. (1997a y b) informaron que Fe^{+2} , Mn^{+2} , Cu^{+2} y Co^{+2} pueden catalizar la descomposición de APA. Además de catalizar la descomposición del APA, la presencia de metales de transición, como el cobre (Cu) y la plata (Ag), también puede incrementar la formación de radicales que mejoran la eficiencia de desinfección del APA (Orta de Velásquez y col., 2017).

Liu y col. (2014) estudiaron el efecto de la **salinidad y la dureza** del agua en diferentes formulaciones de APA. Por un lado estudiaron el efecto de la salinidad con NaCl y sal marina disuelta en agua destilada para alcanzar las concentraciones de 1% (10 g / L) y 3% (30 g / L). Los resultados de este estudio demostraron que la salinidad afecta la degradación del APA en todas las formulaciones ensayadas. La dureza del agua tiene solo un ligero impacto en la descomposición del APA (Luukkonen y col., 2014).

Numerosos estudios sobre APA han informado que la presencia de **materia orgánica** en solución conduce a un significativo consumo de APA (Koivunen y col., 2005; Liu y col. 2014; Pedersen y col., 2009; Pedersen y col., 2013). La eficiencia de la desinfección con APA aumenta con la disminución de los sólidos suspendidos totales (SST) y la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) (Gehr y Cochrane, 2002; Domínguez Henao, 2017; Domínguez Henao y col., 2018). Los SST pueden tener impacto en la desinfección de APA a través de la demanda oxidativa y actuando como escudos protectores para microorganismos (Domínguez Henao y col., 2018).

Además, similar a otros desinfectantes químicos, las reducciones microbianas aumentan con el aumento de la temperatura (Stampi y col., 2001).

En la Tabla 1.9 se presentan los parámetros del agua que pueden afectar la eficiencia biocida del APA:

Parámetro del agua	Efecto sobre el APA	Autor.
pH	A pH > 9 disminuye la eficiencia biocida	Kitis (2004); Luukkonen y col. (2014)
Salinidad	Incrementa la fuerza iónica e incrementa la descomposición del APA	Liu y col. (2014)
Dureza	Bajo impacto en la descomposición del APA	Liu y col. (2014)
Fe^{+2} , Mn^{+2} , Cu^{+2} y Co^{+2}	Catalizan la descomposición del APA	Yuan y col. (1997a y b), Wagner y col. (2002), Kitis (2004), Zhao y col. (2008), Pedersen y col. (2013), Luukkonen y col. (2014), Luukkonen y Pehkonen (2016)
Cu^{+2} y Ag^{+}	Incrementan la eficiencia biocida	Orta de Velásquez y col. (2017)
Materia orgánica (SST y DQO)	Existe una demanda oxidativa del APA. Los SST generan una protección para los microorganismos en la desinfección.	Koivunen y col. (2005), Liu y col. (2014), Pedersen y col. (2009), Pedersen y col. (2013); Gehr y Cochrane (2002); Domínguez Henao y col. (2018)
Temperatura	La eficacia de desinfección con APA aumenta al incrementar la temperatura.	Stampi y col. (2001)

Tabla 1.9. Parámetros del agua que afectan la eficiencia del APA como biocida.

El APA puede ser una alternativa al cloro para el control del mejillón dorado ya que, en comparación con el cloro, tiene un mayor potencial de oxidación (1,76 frente a 1,48 V), un costo aceptable para su aplicación y menor formación subproductos de la desinfección (Du y col., 2018). Si bien el APA fue evaluado como molusquicida sobre otras especies, mostrando resultados similares al cloro, estos resultados no son extrapolables. Por lo tanto, es necesario evaluar el producto sobre la especie objetivo: *L. fortunei*.

El producto Sanurfloc Bioxi B, es formulado a base de APA y coadyuvantes. Sanurfloc Bioxi B es producido y estandarizado en planta por la empresa SABINUR S.A.C.I.F.I.A www.sabinur.com.ar, en Buenos Aires y se encuentra habilitado para su comercialización en el Mercosur. Se trata de un producto oxidante con alta eficiencia biocida sobre microorganismos heterótrofos totales, coliformes fecales, hongos, levaduras y cianobacterias tóxicas (Martinez y col., 2017; Martinez y col., 2019). El monitoreo del producto residual es fácil de determinar a través de kits de tiras reactivas que brindan un resultado al instante. Sanurfloc Bioxi B es aplicado en varias plantas de tratamiento de aguas ubicadas sobre las costas del Río de la Plata, con caudales de procesamiento de agua cruda de aproximadamente 2000 m³/h aplicando producto de forma continua, en un rango de dosis de 20-30 mg/l.

Para llevar a cabo la aplicación tecnológica del producto Sanurfloc Bioxi B es importante analizar la efectividad molusquicida a diferentes dosis y tiempos de contacto sobre individuos adultos de mejillón dorado. Existen varios factores a considerar para la realización de dicho estudio:

- 1- Tamaño, densidad y estado fisiológico del organismo de estudio.
- 2- Características fisicoquímicas y microbiológicas del medio acuoso
- 3- Factores que influyen en la eficiencia molusquicida de los productos oxidantes.

Dado que diferentes tamaños y densidades de mejillón dorado tendrán respuestas diferentes a iguales concentraciones de molusquicidas, deben ser definidas la longitud valvar del organismo de estudio y la densidad en el ensayo. En relación al estado fisiológico, ciertos contaminantes presentes en el agua pueden incrementar la tasa de mortalidad y dado que normalmente los individuos de estudio son obtenidos del medio ambiente debe realizarse una aclimatación de los moluscos previamente al ensayo, evitando de esta manera mortalidad asociada al estrés del organismo.

Las características fisicoquímicas y microbiológicas del medio acuoso, deben ser definidas debido a la interacción que presentan con los moluscos y con los productos molusquicidas respectivamente. Evaluando principalmente pH, temperatura, salinidad y materia orgánica como parámetros fisicoquímicos y organismos susceptibles de ser alimento para los mejillones dorados. Si bien la realización de ensayos molusquicidas utilizando agua de consumo declorada es útil, la aplicación del producto se realizará finalmente sobre un río sin tratar (agua cruda). Por lo tanto, realizar los ensayos molusquicidas sobre agua proveniente del sitio donde se realizará el tratamiento, puede informar las dosis de aplicación más precisas.

En relación a los factores que influyen en la eficiencia molusquicida de los productos oxidantes, es importante evaluar la demanda oxidativa del producto al ser aplicado sobre el agua cruda.

Dado que en bibliografía los resultados sobre la eficiencia molusquicida del cloro son muy variables, es también importante evaluar el cloro en un mismo diseño experimental y utilizar agua cruda, para lograr una comparación con el efecto molusquicida del producto Sanurfloc Bioxi B.

Además de la determinación de la mortalidad, es importante evaluar otras actividades del mejillón dorado como son la movilidad, así como estudiar si el organismo se aleja de las fuentes de tóxicos. También es importante evaluar el efecto de los productos oxidantes sobre la adhesión del mejillón dorado y la tasa de filtración en presencia de los molusquicidas.

Es importante realizar la comparación con la efectividad molusquicida del cloro, el tratamiento más común frente a la bioincrustación. Conocer la efectividad molusquicida del producto Sanurfloc Bioxi B, nos permitirá evaluar su potencial aplicación en plantas de tratamiento de agua y todas aquellas que industrias que utilicen agua del río contaminadas con mejillón dorado.

1.6. OBJETIVOS DEL TRABAJO

1.6.1. Objetivo general

Realizar el estudio comparativo y combinado de la efectividad molusquicida de cloro y el producto Sanurfloc Bioxi B sobre el estadio adulto de los bivalvos incrustantes *Limnoperna fortunei* (mejillón dorado).

1.6.2. Objetivos específicos

Puesta a punto de las condiciones de aclimatación al laboratorio de especímenes de *L. fortunei*.

Caracterización fisicoquímica, microbiológica y biológica de la fuente de agua utilizada en nuestro estudio: agua del Río de la Plata.

Puesta a punto de técnicas de ensayo de mortalidad y ensayo de velocidad de filtración de los mejillones dorados.

Evaluar la efectividad molusquicida utilizando diferentes concentraciones de cloro y de Sanurfloc Bioxi B en forma individual. Determinar las dosis óptimas de cada producto. Evaluar la mortalidad, la movilidad, la adhesión y la filtración bajo los tratamientos con molusquicidas.

Evaluar la efectividad molusquicida con aplicación secuencial de combinaciones de la dosis óptima de cloro y de Sanurfloc Bioxi B. Evaluación de la mortalidad, la movilidad, la adhesión y la filtración bajo los tratamientos con molusquicidas.

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. OBTENCIÓN DE LOS MEJILLONES DORADOS

Ubicación y características del sitio de muestreo. La obtención de las muestras de mejillón dorado *Limnoperna fortunei* se realizó en el Río de la Plata, entre los puntos (34°47'49.9"S 57°59'31.5"W) y (34°48'13.6"S 57°59'08.0"W) donde se ha observado su presencia regularmente (Figura 2.1). En la zona de muestreo, la temperatura aérea mensual promedio varió entre 20-30 °C en enero y entre 7-15 °C en julio durante el año 2018 (Figura 2.2) mientras que la temperatura mensual promedio del agua fue de 24,3 °C en enero y de 11,7 °C en julio de ese mismo año (Figura 2.3).



Figura 2.1. Punto de muestreo en la playa de Punta Lara sobre el Río de la Plata. Fuente: Google Maps.

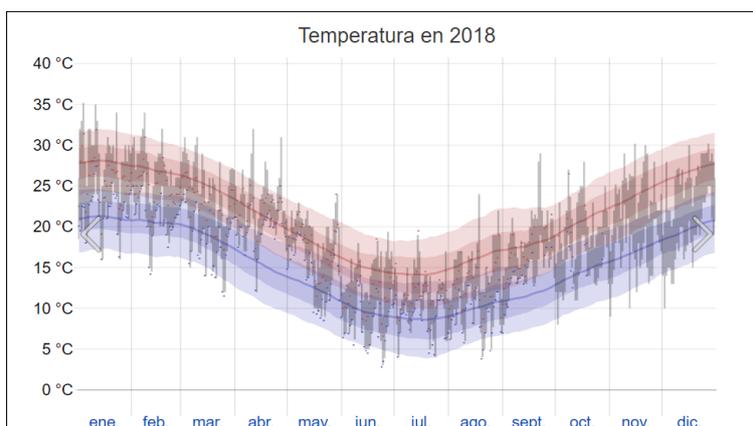


Figura 2.2. Valores de temperatura aérea del año 2018, el intervalo diario de temperaturas reportadas (barras grises) y las máximas (marcas rojas) y mínimas (marcas azules) de 24 horas, colocadas arriba del promedio diario de la máxima (línea rojo claro) y de la mínima (línea azul claro), con las bandas de los percentiles 25 a 75 y 10 a 90. Fuente: Aeroparque Jorge Newbery, Argentina (es.weatherspark.com).

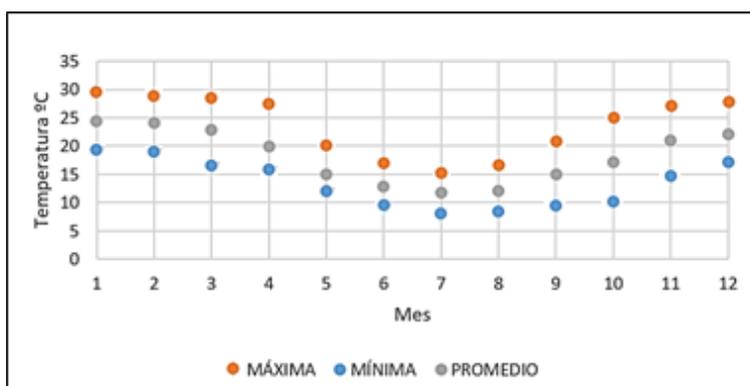


Figura 2.3. Temperatura del agua en superficie, datos de Ponton Intersección ubicado en 34°41' S 57°57' W. S Estas cifras muestran la temperatura media mensual del agua en Punta Lara. Las temperaturas medias, mínimas y máximas del agua se calculan sobre la base de los datos de los últimos 10 años. Fuente: Servicio de Hidrografía Naval.

Toma de muestras y transporte. La recolección de mejillones dorados se realizó en la costanera en la playa de Punta Lara, en los momentos de marea baja. Los individuos adheridos firmemente sobre el murallón (Figura 2.4), fueron recolectados manualmente y colocados en tanques plásticos sumergidos en la misma agua de río. Las muestras de mejillón dorado fueron transportadas inmediatamente al laboratorio para su procesamiento. Se realizaron tres muestreos:

- Primer muestreo: febrero del año 2018.
- Segundo muestreo: abril del año 2018.
- Tercer muestreo: junio del año 2018.

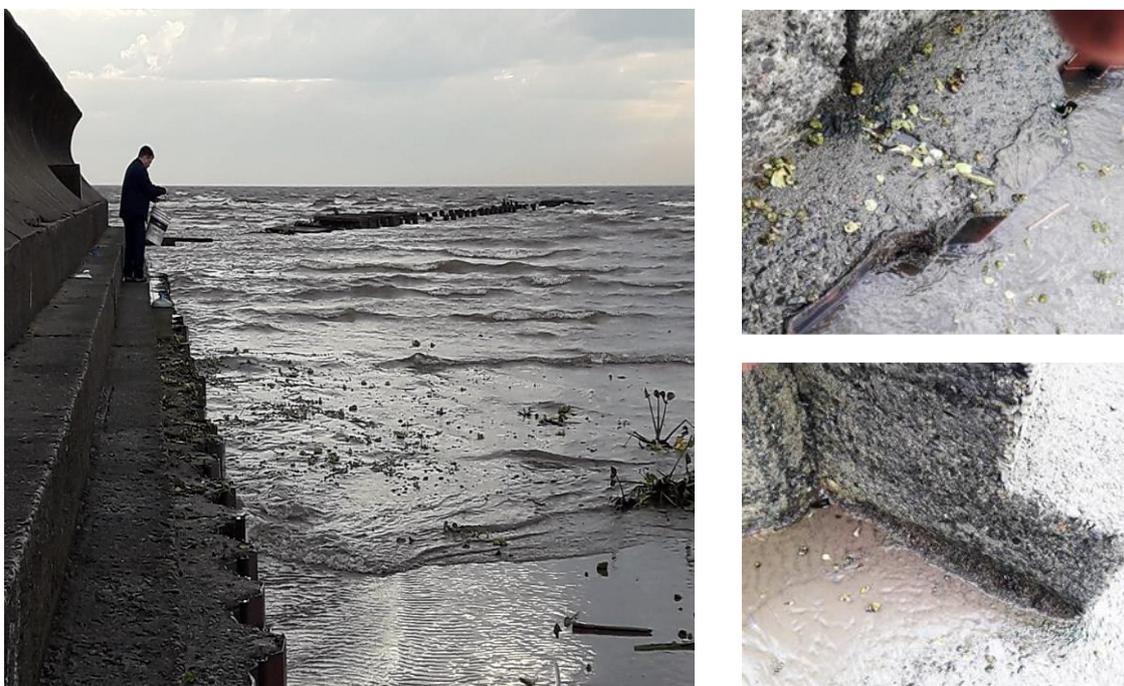


Figura 2.4. Toma de muestra de mejillones dorados en Punta Lara, Río de La Plata. Los mejillones dorados se encuentran fuertemente adheridos a la estructura. Fotografías: Virginia Martinez.

2.2. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AGUA DE RÍO

En este trabajo se ha utilizado agua del Río de la Plata como medio acuoso para llevar a cabo las siguientes actividades:

- Transporte de los mejillones dorados desde el sitio de muestreo hacia el laboratorio
- Aclimatación de los mejillones dorados
- Puesta a punto y realización de los ensayos de eficiencia de los molusquicidas.

La obtención del agua dulce se ha realizado en el mismo sitio de muestreo de los mejillones dorados, lugar apartado de descargas de efluentes industriales.

Para cada actividad a desarrollar se ha recogido agua fresca en bidones plásticos de 20 litros y transportado inmediatamente al laboratorio para su análisis. Se ha utilizado este suministro de agua, en un periodo no mayor a 8 horas desde su recolección. Resulta importante su caracterización físico química, microbiológica y ficológica.

Caracterización. Todas las muestras de agua recibidas, fueron inmediatamente analizadas fisicoquímicamente antes de realizar el recambio de agua de los acuarios. Los análisis microbiológicos, el análisis cualitativo y cuantitativo de fitoplancton se realizaron con una frecuencia de 15 días. Se determinaron los siguientes parámetros según las técnicas definidas en el *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA; AWWA; WPCF; 2012), el método utilizado se indica entre paréntesis:

2.2.1. pH (SM-4500H+ B)

El pH del agua de río fue determinado con un peachímetro Hanna Modelo HI 8424., la calibración del equipo se realizó periódicamente mediante el empleo de soluciones tampón de pH 4,02, 7,02 y 10,02 disponibles comercialmente.

2.2.2. Temperatura (SM-2550)

La temperatura del agua de río fue determinada utilizando termómetro incorporado al conductímetro HACH Senslon5 51800-18, en su función medidor de temperatura.

2.2.3. Color (SM-2120-C)

El color puede ser expresado como “color verdadero” o “color aparente”, este último engloba no solo el color debido a las sustancias disueltas sino también a las materias en suspensión. El color verdadero puede determinarse en la muestra filtrada o centrifugada. Por otra parte, el color aparente se determina sobre la muestra original. En este trabajo se determinó el color aparente utilizando un espectrofotómetro HACH DR/890, se utilizó el método 8025 que corresponde a una adaptación del método platino-cobalto (SM2120-C), del *Standard methods for the examination of water and wastewater*. El color aparente determinado se expresó como unidades de color.

2.2.4. Salinidad (SM-2520 B)

La salinidad es la determinación de la masa de sales disueltas en una masa dada de solución. La salinidad es una escala relativa basada en solución de cloruro de potasio, un valor de 35 es equivalente a 32,4356 g KCl en 1000 g de solución a 15 °C. Su determinación es indirecta a través de la conductividad. En este trabajo se determinó la salinidad utilizando un conductímetro HACH

Senslon5 51800-18. El medidor calcula la salinidad en base a la Escala de salinidad práctica extendida de 1978, como se menciona en la 17ª edición de *Standard Methods*, 25200 B. El rango aplicable es de 0 a 42 ‰ y de -2 a 35 ° C. La salinidad determinada se expresó como partes por mil (‰).

2.2.5. Turbidez (SM-2130 B)

La turbidez del agua es producida por materias en suspensión, como arcilla, cieno o materias orgánicas e inorgánicas finamente divididas, compuestos orgánicos solubles coloreados, plancton y otros microorganismos. La turbidez es una expresión de la propiedad óptica que origina que la luz se disperse y absorba en vez de transmitirse en línea recta a través de la muestra. En la dispersión luminosa también intervienen el tamaño, la forma y el índice de refracción de las partículas. En este trabajo se determinó la turbidez utilizando un espectrofotómetro HACH DR/890, se utilizó el método 8237. La turbidez determinada se expresó como NTU.

2.2.6. Conductividad (SM-2510)

La conductividad es una expresión numérica de la capacidad de una solución para transportar una corriente eléctrica. Esta capacidad depende de la presencia de iones y de su concentración total, su movilidad, valencia y concentraciones relativas, así como de la temperatura de la medición. En este trabajo se determinó la conductividad utilizando un conductímetro HACH Senslon5 51800-18. La conductividad determinada se expresó como $\mu\text{S}/\text{cm}$.

2.2.7. Metales (SM-3500 As, SM-3500 Fe, SM-3500 Mn, SM-3500 Pb, SM-3500-Cr)

Se determinaron los metales: arsénico, hierro, manganeso, plomo y cromo mediante espectrofotometría de absorción atómica.

2.2.8. Sólidos disueltos totales (SM-2540 C)

El método estándar para la determinación de TDS (Sólidos Disueltos Totales) es evaporar la muestra a sequedad a 180 ° C, luego pesar el residuo. Otra forma de estimar TDS es calculando la concentración de cloruro de sodio que tendría la misma conductividad que la muestra a la misma temperatura. En este trabajo se determinaron los Sólidos disueltos totales utilizando un conductímetro HACH Senslon5 51800-18. El medidor reporta el valor TDS medido en mg/l de cloruro de sodio comparando la conductividad y la temperatura de la muestra con los datos almacenados en la memoria del medidor. Los datos se obtuvieron de Procedimientos empíricos utilizando soluciones de cloruro de sodio.

2.2.9. Sólidos suspendidos totales (SM-2540 D)

Los sólidos totales son los residuos de material que quedan en un recipiente después de la evaporación de una muestra y su consecutivo secado en estufa a temperatura definida. Los sólidos totales incluyen los **sólidos suspendidos totales**, o porción de sólidos totales retenida por un filtro, y los **sólidos disueltos totales** o porción que atraviesa el filtro. En este trabajo se determinaron los sólidos suspendidos totales utilizando un espectrofotómetro HACH DR/890, se utilizó el método 8006. Los sólidos suspendidos totales fueron expresados como mg/l .

2.2.10. Oxígeno disuelto (SM-4500 O G)

El oxígeno disuelto fue determinado sobre la muestra de agua de río, en forma directa, con un electrodo de oxígeno OXYGEN METER MODELO DO-5510.

2.2.11. Nitrógeno amoniacal

Los compuestos de amoníaco se combinan con el cloro para formar monocloramina. La monocloramina reacciona con el salicilato para formar 5-aminosalicilato. El 5-aminosalicilato se oxida en presencia de un catalizador de nitroprusiato de sodio para formar un compuesto de color azul. El color azul está enmascarado por el color amarillo del exceso de reactivo presente para dar una solución final de color verde. En este trabajo se determinó la concentración de nitrógeno amoniacal utilizando un espectrofotómetro HACH DR/890, se utilizó el método 8155. La resultados se expresaron como mg/ de nitrógeno amoniacal.

2.2.12. Demanda química de oxígeno (SM-5220 D)

La demanda química de oxígeno se utiliza como una medida del equivalente de oxígeno del contenido de materia orgánica de una muestra susceptible de oxidación por un oxidante químico fuerte. En este procedimiento se utilizó el kit HACH, la digestión de la muestra se realizó con dicromato de potasio, a 150 °C durante 2 horas. La solución del kit también contiene iones de plata como catalizador e iones de mercurio como complejante de cloruros. Los compuestos orgánicos oxidables reducen el ion dicromato produciendo una coloración verde. Para la determinación de la concentración de DQO fue empleado un espectrofotómetro HACH DR/890, se utilizó el método 8000. La DQO se expresó como mg de O₂/l.

2.2.13. Demanda bioquímica de oxígeno (SM-5210 B)

La Demanda Biológica de Oxígeno consiste en la determinación de la cantidad de oxígeno consumido, en un período de tiempo (generalmente 5 días) y a una temperatura determinada (generalmente 20°C), por las bacterias al oxidar la materia orgánica en una muestra de agua. El equipo DBO Logic de INGELAB, utiliza el método de determinación manométrico. Para la determinación de DBO, se introdujeron diferentes volúmenes de la muestra en sendos reactores, se adicionaron los micronutrientes (tampón de fosfatos, sulfato de magnesio, cloruro de calcio, cloruro férrico y cloruro de amonio) y un inóculo microbiológico. Se midió el consumo de oxígeno de forma indirecta por la caída de la presión. La DQO se expresó como mg de O₂/l.

2.2.14. Demanda de cloro

La demanda de cloro es la diferencia entre la cantidad de cloro añadida al agua y la cantidad de cloro residual libre y residual combinado que permanece al final del periodo de contacto especificado. La demanda de cloro, se determinó analizando el cloro residual sobre soluciones de agua de río a las cuales se les adicionó cloro en concentraciones de 1 a 15 ppm. El tiempo de contacto fue de 30 minutos. Se informó la demanda de cloro como aquella dosis de cloro que alcanza el punto de quiebre (valor mínimo en la curva de la Figura 2.5).

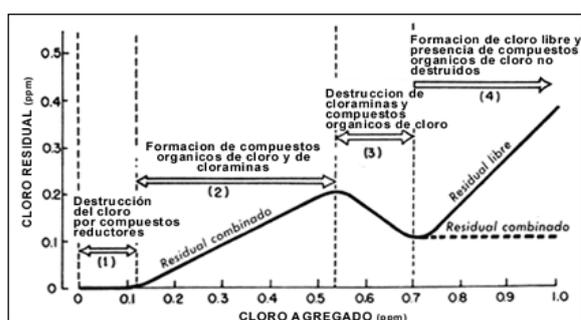


Figura 2.5. Curva de demanda de cloro. Fuente: Ramírez Quiroz, 2005.

2.2.15. Clorofila a (SM-10200 H)

La concentración de pigmentos fotosintéticos se utiliza ampliamente para calcular la biomasa del fitoplancton. Todas las plantas verdes contienen clorofila a, que constituye aproximadamente del 1 al 2 por 100 del peso seco de las algas planctónicas. Para la determinación del pigmento se filtraron 500 ml de muestra con papel de filtro Whatman GF/F. Se colocó el filtro en un tubo Falcón de 15 ml, cubierto exteriormente con papel metálico al abrigo de la luz, y se adicionó 5 ml de metanol. Se incubó a 4 °C durante 24 h. Se midió el extracto en metanol a las longitudes de onda 665 y 760 nm, antes y después de acidificar con 2 gotas de HCl 0,1 N.

Se calculó la concentración de clorofila a:

$$CL\ a\ (\mu\text{g/l}) = 2,72 * [(Abs\ 665 - Abs\ 760) - (Abs\ 665\ acid - Abs\ 760\ acid)] * 11,62 * V$$

Donde V= Volumen del extracto en ml/l de agua filtrada. Para la muestra V= 5/0,5=10

2.2.16. Recuento de bacterias heterótrofas totales (SM-9215B)

Se tomó una muestra de agua de río y se reservó refrigerada en un frasco estéril hasta su procesamiento. El tiempo máximo recomendado entre la toma de la muestra y su estudio es de 6 horas. Para su análisis se homogenizó la muestra mediante agitación manual. En esterilidad, se realizaron diluciones seriadas, tomando 1 ml y diluyendo en 9 ml de agua peptona 0,1%. Las diluciones se homogenizaron con agitador mecánico durante 15 segundos. Se sembró 1 ml de muestra y 1 ml de cada dilución, en sendas placas de Petri vacías, realizando este proceso por duplicado. Se agregó sobre cada placa el Medio *Plate Count Agar* PCA (composición: 5 g/l peptona de caseína, 2,5 g/l extracto de levadura, 1 g/l de glucosa y 14,5 g/l de agar-agar, pH 7,0 ± 0,1. Esterilizado por autoclave durante 15 minutos a 121° C) previamente fundido y entibiado. Se mezcló el medio PCA con el inóculo realizando movimientos circulares. Se dejó enfriar y solidificar. Se incubaron las placas invertidas a 36 °C durante 48 h. Se contaron las colonias con contador de placas, seleccionando aquellas que presentaron entre 30-300 UFC/ml.

$$\text{Cálculos: UFC/ml} = ((N1+N2)/2) * D$$

Donde N1 y N2 son las colonias contadas en las cajas de la misma dilución y D es el factor de dilución aplicado.

2.2.17. Coliformes fecales (SM-9225)

La determinación de coliformes fecales se realizó mediante la técnica de número más probable (NMP) en tubo con caldo Mac Conkey (20 g/l digestión pancreática de gelatina, 5 g/l de bilis de buey, 10 g/l de lactosa y 0,01 g/l de purpura de bromocresol, pH 7,3 ± 0,2). Primero se realizaron las diluciones necesarias de la muestra en agua peptonada 0,1%. Luego 1 ml de las diluciones se inocularon en caldo Mac Conkey por triplicado con campana de Durham y se incubaron a 37 °C durante 24-48 horas. Se repicaron los tubos positivos en caldo EC (20 g/l de triptona, 5 g/l de lactosa; 1,5 g/l de sales biliares nº 3; 4 g/l de fostato de dipotasio; 1,5 g/l de fosfato dihidrógeno de potasio y 5 g/l de cloruro de sodio) y se incubaron a 44 °C durante 24-48 horas. Se cuantificaron los tubos positivos y se refirieron a la distribución de NMP (número más probable). Los resultados se expresaron como NMP/100 ml de muestra.

2.2.18. Recuento y análisis de fitoplancton (SM-10200 F)

Para realizar el análisis cuantitativo o recuento de fitoplancton presente en la muestra de agua de río, se utilizaron cámaras de sedimentación y microscopio invertido siguiendo el método Utermöhl de 1958.

Las muestras se homogenizaron manualmente, dando giros en forme vertical y horizontal, durante 2 minutos. Se seleccionó el volumen de la cámara a utilizar (2, 10 y 25 ml de capacidad) teniendo en cuenta la densidad de fitoplancton en la muestra y la cantidad de sedimento.

La cámara de sedimentación a utilizar se llenó totalmente y se cubrió con la tapa de vidrio, sin dejar burbujas de aire en el interior. Luego se la dejó reposar sobre una superficie plana y nivelada durante 24 hs. Se realizó la observación al microscopio invertido. Se realizó el recuento en al menos 30 campos y se realizó el siguiente cálculo:

$$\text{Recuento de individuos/ml (ind. /ml)} = (490,625 \cdot x) / (n \cdot A \cdot V)$$

Dónde: 490,625 es el área de la cámara de sedimentación, **x** es el número total de individuos contados, **n** es el número de campos observados, **A** es el área del campo (Tabla 2.1), **V** es el volumen de la cámara de sedimentación (ml).

AUMENTO DEL OBJETIVO	DIÁMETRO DEL CAMPO (mm)	ÁREA DEL CAMPO (mm) ²
4 X	5	19,62500
10 X	2	3,14000
20 X	1	0,78500
40 X	0,5	0,19625
CÁMARA DE SEDIMENTACIÓN	DIÁMETRO (mm)	ÁREA (mm) ²
	25	490,62500

Tabla 2.1. Datos de los campos del microscopio invertido

Para realizar el análisis cualitativo, se centrifugó 10 ml de muestra, se descartó el sobrenadante dejando 1 ml para observación en fresco en microscopio invertido. Se realizó la determinación de los taxones en la muestra según Bourrelly (1972).

2.3. PRODUCTOS MOLUSQUICIDAS

2.3.1 Hipoclorito de sodio

2.3.1.1 Determinación de principio activo cloro

Se utilizó hipoclorito de sodio de concentración de 100 g de cloro/l. La determinación de cloro activo en el producto se realiza a través de una volumetría. Se tomaron 2,5 ml de la solución de hipoclorito de sodio y se diluyó hasta 100 ml en un matraz aforado. Luego se tomaron 25 ml de esta dilución y se transfirieron a un Erlenmeyer de 250 ml, se adicionó aproximadamente 1 g de cristales de yoduro de potasio y se acidificó con 4 ml de ácido acético glacial. Posteriormente, se tituló con tiosulfato de sodio 0,1 N, hasta que el color amarillo del yodo desapareció, se adicionó 1 ml de solución indicadora de almidón 0,5 % y se continuó la titulación hasta que el color desapareció.

$$C = (141,8 \times V \times N) / V_m$$

Donde C es el cloro disponible en porcentaje p/v, V es el volumen de tiosulfato de sodio gastado en ml, N es la normalidad del tiosulfato de sodio, Vm es el volumen de la muestra en ml y 141,8 un factor de conversión.

2.3.1.2 Determinación de cloro residual

Para la determinación de cloro residual o cloro libre se utilizó un medidor de Turbidez y Cloro Libre/Total (Hanna modelo HI 93414). Este método es una adaptación del Método 330.5 de USEPA y Método 4500-Cl G de *Standard Methods*. La reacción entre el cloro y el reactivo DPD origina una coloración rosa en la muestra que es detectado por el medidor. Las mediciones de Cloro Libre o Total pueden realizarse en el rango de 0,00 a 5,00 mg/l.

2.3.2 Sanurfloc Bioxi B

2.3.2.1 Determinación de principio activo ácido peracético

El producto Sanurfloc Bioxi B, fue provisto por la empresa SABINUR SACIFIA. La determinación de principio activo en el producto (activo B) se realiza a través de una volumetría.

Se pesó entre 0,25 y 0,30 ml de producto en un Erlenmeyer de 250 ml, se registró el peso de la muestra (M). Luego, se adicionó 50 ml de agua destilada y 25 ml de solución de ácido sulfúrico al 25 % p/v. Se tituló el peróxido de hidrógeno con solución de permanganato de potasio 0,1 M hasta débil coloración rosada y se registró el volumen gastado (mp). Luego se adicionó aproximadamente 1 g de yoduro de potasio y se agitó hasta su disolución (se observó un desprendimiento gaseoso), el yodo liberado se tituló con tiosulfato de sodio 0,1 N utilizando almidón 0,1 % como indicador de punto final, se registró el volumen de tiosulfato (mt). Luego se calcularon las concentraciones de

$$Ca (\% H_2O_2) = 850 \text{ mp} / M$$

Donde Ca es la concentración de H_2O_2 en % p/v, 850 es un factor de conversión, mp es el volumen de permanganato de potasio utilizado en ml, M es el peso de la muestra en mg.

$$Cp (\% PA) = 380 \text{ mt} / M$$

Donde Cp es la concentración de ácido peracético en % p/v, 380 es un factor de conversión, mt es el volumen de tiosulfato de sodio utilizado en ml, M es el peso de la muestra en mg.

2.3.2.2. Determinación de ácido peracético residual

Para la determinación rápida y semicuantitativa se utilizó Test Ácido peracético Método colorimétrico con tiras de ensayo MQuant™, número de catálogo 1.10084.0001 (http://www.merckmillipore.com/AR/es/product/Peracetic-Acid-Test,MDA_CHEM-110084).

El ácido peracético reacciona con una amina aromática para formar un producto de color azul. La concentración de ácido peracético es medida semicuantitativamente por comparación visual entre la zona de reacción de la tira de ensayo con las zonas de una escala colorimétrica. El intervalo de medida fue de 0, 5 - 10 - 20 - 30 - 50 mg/l peracético. Se introdujo la zona de reacción de la tira de ensayo durante 1 segundo en la muestra preparada (pH entre 2 y 10; temperatura entre 15-25 ° C). Se dejó escurrir el exceso de líquido por el borde longitudinal de la tira sobre un pañuelo de papel absorbente y, después de 5 segundos, se clasificó el color de la zona de

reacción de acuerdo con una zona color de la etiqueta. Se leyó el correspondiente valor de medición en mg/l de ácido peracético o el valor intermedio (figura 2.6).

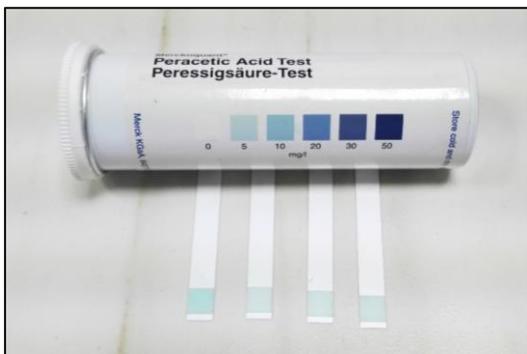


Figura 2.6. Test de ácido peracético residual.

La demanda de oxidante (activo de Sanurfloc Bioxi B) se determinó como la diferencia de la concentración agregada de activo y la concentración de activo residual luego de 1 hora de contacto.

2.4. PROCESAMIENTO Y ACLIMATACIÓN DEL MEJILLON DORADO AL LABORATORIO

2.4.1. Procesamiento de muestras de mejillón dorado

Una vez recibidas las muestras de mejillón dorado en el laboratorio, se separó manualmente el agregado de mejillones que se encontraban unidos entre sí mediante el hilo bisal (Figura 2.7), este fue cortado con tijera. Se lavaron los mejillones con agua corriente sin cloro y se eliminaron los individuos muertos.



Figura 2.7. Muestras de mejillón dorado obtenidas del Río de la Plata y acuarios. Fotografías: Virginia Martinez.

2.4.2. Puesta a punto y selección de las condiciones de ensayo de aclimatación de los mejillones dorados

Se realizaron experimentos preliminares con el objetivo de fijar las siguientes condiciones del ensayo aclimatación. Para ello, se colocaron los mejillones en acuarios con agua de río a 20° C durante 2 meses. La densidad población fue de 10 mejillones por acuario con una capacidad de 500 ml. El fotoperiodo fue de 8 horas de luz y 16 de oscuridad. No se proporcionó ni aireación ni filtración al sistema. La frecuencia del recambio del agua de río fue de 3 veces por semana. A tal efecto, se concurreó 3 veces por semana a Punta Lara con el fin de realizar una nueva toma de muestra de agua de río para el recambio correspondiente. Las muestras de agua de río se trasladaron inmediatamente al laboratorio. Se examinaron diariamente los acuarios, eliminándose inmediatamente los organismos muertos. Bajo tales condiciones de aclimatación, se evaluó la mortalidad de los mejillones dorados de diferentes tamaños de longitud valvar, según la clasificación del Montalto y Marchese (2003): juveniles < 6 mm (tamaño 1), adultos 6-15 mm (tamaño 2) y 15-27 mm (tamaño 3). En esta puesta punto se utilizaron los mejillones dorados obtenidos en el primer muestreo. Una vez fijadas las condiciones del ensayo, se procedió a realizar el ensayo de aclimatación.

2.4.3. Protocolo de aclimatación de los mejillones dorados.

Para todos los ensayos que se indican en este trabajo, se efectuó la aclimatación al laboratorio de la siguiente manera: se colocaron los mejillones de 6-15 mm de longitud valvar (ver 3.1), en acuarios con agua de río a 20 °C por al menos 4 semanas (Rajagopal, 2002). La densidad población fue de 10 mejillones por acuario con una capacidad de 500 ml. El fotoperiodo y condiciones de aireación fueron similares a las descritas en la sección 2.4.2. Se examinaron diariamente los acuarios, eliminándose inmediatamente los organismos muertos.

Los experimentos con los productos molusquicidas se realizaron con los organismos sobrevivientes, luego del periodo de aclimatación al laboratorio.

2.5. ENSAYO DE EFECTIVIDAD MOLUSQUICIDA

En los ensayos que se describen a continuación se utilizaron 10 mejillones dorados de longitud valvar entre 6-15 mm, los cuales fueron colocados en acuarios de 500 ml de capacidad. El medio acuoso utilizado fue el agua de río (demanda de cloro de 4 ± 0.5 mg/l), con una frecuencia de recambio de 3 veces por semana manteniendo la dosis de cada tratamiento diariamente. La temperatura de trabajo fue de 20°C y el fotoperiodo fue de 8 horas de luz y 16 de oscuridad.

2.5.1. Puesta a punto de la técnica para la determinación de la mortalidad del mejillón dorado bajo tratamientos con cloro

Se realizó la puesta a punto de la técnica para la determinación de la mortalidad del mejillón dorado. Para ello se utilizó el cloro como agente molusquicida. El criterio de mortalidad fue la observación de las valvas abiertas de los mejillones, sin respuesta de los tejidos expuestos al estímulo mecánico (Rajagopal y col., 2003).

Se evaluaron las dosis de 2,5; 5 y 10 mg/l de cloro, se utilizaron 5 réplicas por cada tratamiento y 15 réplicas para el control sin molusquicida (Tabla 2.2). El tiempo de contacto fue como

máximo 60 días. El porcentaje de mortalidad fue evaluado diariamente y los resultados fueron presentados como el porcentaje de mortalidad en función del tiempo. Este ensayo utilizó los mejillones dorados obtenidos en el primer muestreo.

Tratamiento	Réplicas	Número de individuos
Control	15	150
2,5 mg/l de cloro	5	50
5 mg/l de cloro	5	50
10 mg/l de cloro	5	50
Total		300

Tabla 2.2. Tratamientos de cloro para la puesta a punto de la técnica de mortalidad.

2.5.2. Protocolo de mortalidad del mejillón dorado bajo tratamientos con cloro y Sanurfloc Bioxi B

En el ensayo comparativo se evaluaron los productos cloro y Sanurfloc Bioxi B, el primero como referencia ya que es ampliamente utilizado como molusquicida. En esta etapa, se evaluaron las dosis descritas en la Tabla 2.3, se utilizaron 5 réplicas por cada tratamiento y para el control sin molusquicida. El tiempo de contacto fue de 60 días. Los resultados fueron presentados como el porcentaje de mortalidad en función del tiempo. El principio activo del producto Sanurfloc Bioxi B se denominó activo B y se expresó en mg/l.

Tratamiento	Réplicas	Número de individuos
Control	5	50
1,25 mg/l de cloro	5	50
2,5 mg/l de cloro	5	50
5 mg/l de cloro	5	50
0,75 mg/l de activo B	5	50
1,5 mg/l de activo B	5	50
3,75 mg/l de activo B	5	50
7,5 mg/l de activo B	5	50
15 mg/l de activo B	5	50
30 mg/l de activo B	5	50
Total		500

Tabla 2.3. Tratamientos con cloro y principio activo de Sanurfloc Bioxi B (activo B).

En este ensayo se exploró una dosis de cloro menor que las evaluadas en la puesta a punto (1,25 mg/l) y se evaluó la mortalidad en tiempos más largos (60 días). La finalidad de este ensayo fue comparar el efecto del cloro y del producto Sanurfloc Bioxi B sobre mejillones dorados obtenidos en un mismo muestreo. Es decir un grupo de individuos tomados en la misma época del año, del mismo sitio de muestreo y bajo las mismas condiciones fisicoquímicas del agua del río (Segundo muestreo: abril del año 2018).

Para comparar los resultados se determinó la dosis letal media (DL50). DL50 es la dosis calculada estadísticamente, de un agente químico o físico que se espera que mate al 50% de los organismos de una población bajo un conjunto de condiciones definidas.

Dosis Letal 50 (DL50), se calculó realizando la regresión lineal entre el porcentaje de la mortalidad expresado en unidades probits frente al logaritmo de la dosis para un determinado tiempo de contacto. A partir de la regresión lineal se calculó la dosis para un valor de probit igual a 5. Mientras que la desviación estándar se calcula como:

$$SD = (dosis\ 6\ probit - dosis\ 4\ probit) / \sqrt{n}$$

Se determinó la **dosis óptima** definida como: la menor dosis que permite el mayor porcentaje de mortalidad en el menor tiempo.

2.5.3. Ensayo de combinaciones de Sanurfloc Bioxi B y cloro en forma secuencial

Una vez determinadas las dosis óptimas de cada producto oxidante, se realizó un nuevo ensayo con aplicaciones secuenciales en diferentes proporciones de cada producto. Se evaluaron las combinaciones de 75:25; 50:50, 25:75 de dosis óptima de activo de Sanurfloc Bioxi B y de dosis óptima de cloro, aplicando en todos los casos primero el producto Sanurfloc Bioxi B y luego de 20 minutos la solución de cloro. Esta secuencia de oxidantes fue tomada de la aplicación empírica que se realiza en plantas de tratamiento de aguas. Los controles utilizados fueron 100 % de dosis óptima de Sanurfloc Bioxi B, 100 % de dosis óptima de cloro y una condición sin dosificar molusquicidas. Cada condición se ensayó utilizando 5 réplicas (Tabla 2.4). El ensayo se llevó a cabo durante 60 días y se evaluaron diariamente los parámetros indicados en el punto 2.6: la mortalidad, la movilidad como la capacidad de ascender sobre un sustrato, capacidad de adherirse al sustrato, la filtración y la velocidad de filtración. En este ensayo se utilizaron los mejillones dorados obtenidos en el tercer muestreo.

Tratamiento	Dosis	Activo de B: cloro	Número de réplicas	Número de individuos
0	Sin molusquicida	0:0	5	50
1	15 mg/l activo B	100:0	5	50
4	3,75 mg/l activo B y 3,75 mg/l cloro	25:75	5	50
5	7,5 mg/l activo B y 2,5 mg/l cloro	50:50	5	50
6	11,25 mg/l activo B y 1,25 mg/l cloro	75:25	5	50
9	5 mg/l cloro	0:100	5	50
Total				500

Tabla 2.4. Tratamientos de Sanurfloc Bioxi B, cloro y sus combinaciones. El principio activo de Sanurfloc Bioxi B se indica como activo B.

2.6. CRITERIOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA MOVILIDAD, ADHESIÓN, FILTRACIÓN POR LOS PRODUCTOS OXIDANTES

Movilidad (capacidad de ascenso sobre el sustrato). Los mejillones dorados pueden ascender sobre el sustrato mediante locomoción a través del pie, en nuestro trabajo se evaluó el efecto de los molusquicidas sobre el movimiento ascendente del mejillón dorado. El experimento consistió en colocar especímenes del molusco en el fondo de un acuario, con una columna de agua de 10 cm de altura y luego medir la altura alcanzada por cada individuo. No se evaluaron otros movimientos (descenso o movimientos paralelos a la base) porque únicamente el ascenso resulto más accesible de determinar en forma visual (Iwasaki, 1997, 2015). El sustrato utilizado fue el mismo vidrio del acuario, cuya columna de agua presenta una altura de 10 cm (Figura 2.8). Inicialmente los 10 mejillones se encuentran libres sin adherirse sobre el fondo del acuario. Al transcurrir los días, los mejillones se adhieren a diferentes alturas. La altura denominada c (cm) que puede alcanzar cada mejillón varía entre 0 y 10 cm, por lo tanto cuando la altura $c = 0$ cm se corresponde con 0 %, si la altura $c = 5$ cm se corresponde con 50 % y cuando la altura es 10 indicamos 100 %. El promedio de c entre los 10 mejillones se denominó h y varía entre 0 y 100 %. El promedio de h entre las 3 o 5 réplicas se denominó H y se expresó en porcentaje (Tabla 2.5).

Parámetro	Definición
c	Altura de cada individuo alcanzada en los 10 cm de columna de agua , varia entre 0 y 10 cm
m	Número total de mejillones en el acuario= 10
h	Promedio de c entre los m mejillones, varia entre 0 y 100% y se expresa como porcentaje $h = \sum c$
r	Número de réplicas (3 o 5)
n	Número de mejillones empleados por tratamiento $n = m \cdot r$
H%	Promedio de h entre las réplicas r, se expresa como porcentaje
H7 %	Promedio de H entre 7 días de ensayo, se expresa como porcentaje $H7 = (\sum H)/7$

Tabla 2.5. Definición de parámetros para el análisis del ascenso.

El valor de c se determinó diariamente y los resultados se presentaron como H% frente al tiempo:

Ensayo ascenso número 1: se determinó el comportamiento del mejillón dorado en relación al ascenso vertical, en el primer ensayo se utilizaron un total de 150 mejillones (15 acuarios con 10 individuos cada uno). Se determinó el valor de H durante 30 días. En este ensayo se utilizaron los mejillones dorados obtenidos en el primer muestreo.

Ensayo ascenso número 2: En una segunda etapa se repitió el experimento utilizando un total de 50 mejillones (5 acuarios con 10 individuos cada uno) durante 60 días. En este ensayo se utilizaron los mejillones dorados obtenidos en el tercer muestreo.

Estos dos ensayos permitieron evaluar la movilidad de los mejillones muestreados en diferentes periodos estacionales (febrero y junio).

En el caso de los tratamientos con molusquicidas, el valor de H se determinó diariamente y los resultados se presentaron como H% frente al tiempo, siempre que el número de mejillones vivos fuera constante (m constante). El promedio de H entre los 7 primeros días de ensayo se denominó H7% y los resultados se presentaron como H7% para cada tratamiento.

Se estableció la distribución de los mejillones dorados, como el número de individuos ubicados a 0, 5 y 10 cm de altura luego de 24 horas de tratamiento (Figura 2.8).

Se estableció la distribución de los mejillones dorados entre:

- 1- los individuos adheridos en el fondo del acuario,
- 2- los individuos libres en el fondo del acuario y
- 3- los individuos adheridos en altura en las paredes de del acuario.



Figura 2.8. El acuario presenta una altura de columna de agua de río de 10 cm. Inicialmente 10 mejillones dorados se depositan en el fondo del acuario, luego de la dosificación del producto y diariamente durante los 60 días de ensayo se evaluó la altura alcanzada c (cm).

Capacidad de adhesión sobre el sustrato: La parte central del pie del mejillón presenta una abertura desde la glándula bisal a través de la cual el animal segrega una sustancia filamentososa y elástica, denominada biso, con la que se puede adherir fuertemente al sustrato. Esto es importante en especies como el mejillón pues permite al animal sujetarse y mantener su posición. En este ensayo el sustrato utilizado fue el mismo vidrio del acuario. Se diseñó un experimento para evaluar la adhesividad. Se consideró que el mejillón estaba adherido cuando luego de ejercer una agitación mecánica sobre la solución acuosa, entre 150- 300 rpm durante 30 segundos, el molusco permanecía adherido al vidrio del acuario a través del biso. La agitación mecánica se aplicó utilizando un equipo de test de jarras (Jar test) o flocúmetro (Figura 2.9). Al aplicar una agitación de 150 rpm, los mejillones dorados con el biso debilitado se desprenden. Mientras que al duplicar la velocidad de agitación los mejillones saludables unidos al vidrio permanecían adheridos incluso si se volcaba el contenido líquido del acuario.



Figura 2.9. Equipo Jar test. . Fotografías: Virginia Martinez.

Al iniciar el ensayo todos los moluscos se encuentran libres sin adherirse y ubicados sobre el fondo del acuario.

El cociente entre los mejillones adheridos y el número total de moluscos al inicio del experimento ($n=10$), se denominó a y se expresó como porcentaje. Por lo tanto, si los 10 individuos presentes en el acuario se encuentran adheridos el valor de a será igual al 100 %. El promedio de a entre las 5 réplicas de cada condición se denominó A .

El valor de A (%) se determinó diariamente y los resultados se presentaron como A frente al tiempo, durante los primeros 7 días de experimento, donde el número de individuos fue constante (n = 50) en cada condición de tratamiento.

El promedio de A entre los 7 primeros días de ensayo se denominó A7% y los resultados se presentaron como A7% para cada tratamiento.

Se determinó el **porcentaje de reducción de la adhesión** para cada tratamiento en 7 días, como:

$$R = 100 \cdot (1 - (A7\%) / (A7\%_{\text{control}}))$$

Se evaluó los valores máximos y mínimos de A% en el periodo de los primeros 7 días de experimento.

Los parámetros enunciados se definen en la Tabla 2.6.

Parámetro	Definición
<i>a</i>	Porcentaje de individuos adheridos al vidrio en un acuario: $a = 100 \times (\text{número de mejillones adheridos} / \text{número total de mejillones en el acuario})$
M	Número total de mejillones en el acuario
A	Promedio del valor de <i>a</i> entre las 5 réplicas evaluadas diariamente. $A = (\sum a)/r$
R	Número de réplicas
N	Número total de mejillones empleados por tratamiento $n = m \cdot r$
A7	Promedio de A entre 7 días de ensayo $A7 = (\sum A)/7$

Tabla 2.6. Definición de parámetros para la evaluación de la adhesión a sustrato.

Filtración: Los mejillones dorados tienen la capacidad de filtrar su alimento en las branquias, mediante el ingreso del agua a través del sifón inhalante y eliminación de pseudoheces a través del sifón exhalante. Para alimentarse los moluscos deben abrir las valvas y exponer los sifones al medio. A efectos de evaluar el efecto inhibitorio de los productos se procedió mediante inspección visual a realizar el conteo del número de individuos que presentaron sus sifones expuestos al estar inmersos en el agua de río con la respectiva dosis de molusquicida.

El cociente entre los mejillones filtrando y el número total de moluscos al inicio del experimento (n=10), se denominó p y se expresó como porcentaje. El promedio de p entre las 5 réplicas de cada condición se denominó F. El promedio de F entre los 7 primeros días de ensayo se denominó F7% y los resultados se presentaron como F7% para cada tratamiento.

Se determinó el **porcentaje de reducción de la filtración** respecto al control, para cada tratamiento durante los primeros 7 días, como:

$$R = 100 \cdot (1 - (F7\%) / (F7\%_{\text{control}}))$$

R se expresó en porcentaje. Luego se calculó el promedio de R entre los primeros 7 días = R7.

Se determinó el porcentaje de reducción de la filtración R % mínimo y máximo en el periodo de 0 a 7 días.

Los parámetros enunciados se definen en la Tabla 2.7.

Dado que en los ensayos el número de individuos por réplica disminuye debido al incremento de la mortalidad con el tiempo de contacto, se evaluó el valor promedio de F durante los 7 primeros días del experimento (F7), periodo en el cual no se observó mortalidad bajo ninguna condición. Se evaluó F7 como el valor promedio de F en los primeros 7 días de experimento y se expresó como porcentaje. En este caso el valor de F7 varió entre cero y 100%, cuando F7 es igual a cero significa que ningún mejillón se encontró filtrando durante los 7 días de experimento, mientras que si el valor de F7 es 100 % significa que todos los mejillones se encontraban filtrando durante los 7 días de experimento.

Parámetro	Definición
p	Porcentaje de individuos filtrando en un acuario $p = 100 (\text{número de mejillones filtrando} / \text{número total de mejillones en el acuario})$
m	Número total de mejillones en el acuario
F	Promedio del valor de p entre las 5 réplicas evaluadas diariamente $F = (\sum p)/r$
Fo	Promedio del valor de p entre las 5 réplicas evaluadas diariamente sobre el control sin molusquicida
r	Numero de réplicas
n	Número de mejillones empleados por tratamiento $n = m \cdot r$
F7	Promedio de F entre 7 días de ensayo $F7 = (\sum F)/7$

Tabla 2.7. Definición de parámetros para la evaluación de la filtración.

El promedio de F entre los 7 primeros días de ensayo se denominó F7% y los resultados se presentaron como F7% para cada tratamiento. Durante los primeros 7 días de experimento el número de individuos fue constante ($n = 50$) en cada condición de tratamiento. Se presentaron los valores máximos y mínimos de F% en el periodo de los primeros 7 días de experimento. Se determinó el porcentaje de reducción de la filtración para cada tratamiento en 7 días, como:

$$R7 = 100 * (1 - (F7\%) / (F7\%_{\text{control}}))$$

Se presentó la curva del porcentaje de reducción de la filtración frente a las dosis de molusquicidas.

Velocidad de filtración: La velocidad de filtración fue medida siguiendo el método descrito por Coughlan (1969). El método se basa en la absorción de un colorante vital, el rojo neutro, por los mejillones.

En el ensayo control, se aplicó 3 ppm de rojo neutro y se determinó la concentración de rojo neutro inicial (C_0) y luego la concentración de colorante a 1, 2, 18, 24 y 96 horas (C_t). Esto permitió poner a punto la metodología de filtración y comparar los resultados de velocidad de filtración con los datos bibliográficos.

En los ensayos en los cuales se aplicó tratamientos con molusquicidas, se aplicó 3 ppm de rojo neutro y se determinó la concentración de rojo neutro inicial (C_0) y luego la concentración de

colorante a 20, 24 y 48 horas (Ct), realizando conjuntamente un ensayo control en los mismos tiempos.

La velocidad de filtración fue calculada a los tiempos de contacto mediante de acuerdo a la siguiente ecuación de Coughlan 1969:

$$m = (M / nt) \cdot \text{Log} (C_0/C_t)$$

Donde M es el volumen de la solución; n es el número de animales usados en el experimento; t es el tiempo en horas; Co es la concentración inicial de colorante; Ct es la concentración de colorante al tiempo t; m es la velocidad de filtración en ml.h⁻¹ por mejillón.

Curva de calibración. Para determinar la concentración del colorante vital rojo neutro, se realizó la curva de calibración (Figura 2.10). Se preparó una solución patrón de 1000 mg/l de colorante en agua destilada. Se realizaron patrones de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 y 2,0 mg/l y se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 530 nm y con un camino óptico de 1 cm. Se corrigieron las absorbancias con un blanco de agua destilada y se realizó la curva de calibración.

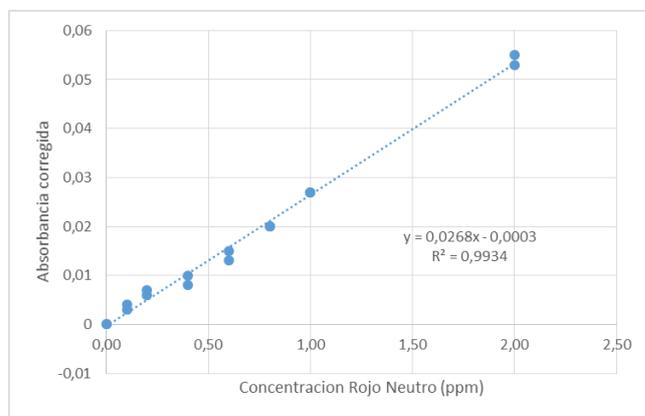


Figura 2.10. Curva de calibración del rojo neutro en agua destilada con una longitud de onda de 530 nm y un camino óptico de 1 cm.

Para determinar la concentración C se utilizó la siguiente ecuación:

$$C (\text{rojo neutro}) = (A + 0,0003) / 0,0268$$

Donde A es la absorción de la muestra.

2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

En todos los casos, los ensayos se realizaron por triplicado (o quintuplicado) y se aplicó el análisis estadístico ANOVA a efectos de evaluar la existencia de diferencias significativas entre los diferentes tratamientos empleando el programa SYSTAT 12.0 (Systat Software, Evanston, IL, USA). Previamente al análisis, se realizó la comprobación estadística de distribución normal de los datos, la homogeneidad de la varianza. El test de comparación de pares de Tukey se evaluó con nivel de significación de 0,05.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA BIOLÓGICO

3.1.1. Resultados de la caracterización fisicoquímica y microbiológica del medio acuoso

A continuación se presentan los resultados de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del agua del Río de la Plata, evaluados entre los meses de julio y septiembre de 2018 (Tabla 3.1).

Nº	Análisis	16/07/2018	23/07/2018	30/07/2018	03/08/2018	07/08/2018	10/08/2018	13/08/2018	17/08/2018	22/08/2018	24/08/2018	27/08/2018	31/08/2018	07/09/2018	10/09/2018	12/09/2018	20/09/2018
1	pH	6,9 ± 0,5	7,4 ± 0,5	7,3 ± 0,5	7,4 ± 0,5	6,8 ± 0,5	7,1 ± 0,5	7,3 ± 0,5	7,9 ± 0,5	8,7 ± 0,2	7,2 ± 0,5	7,8 ± 0,5	8,5 ± 0,3	7,9 ± 0,5	7,8 ± 0,5	7,2 ± 0,5	7,3 ± 0,5
2	Turbiedad (NTU)	19,3 ± 3	9,4 ± 3	16 ± 3	15,7 ± 3	13,4 ± 3	15,3 ± 3	14,2 ± 3	12,3 ± 3	10,6 ± 3	18,9 ± 3	9,5 ± 3	16,4 ± 3	14,6 ± 3	10,8 ± 3	12,4 ± 3	13,5 ± 3
3	Temperatura (°C)	16,3 ± 3	17 ± 3	15,9 ± 3	14,3 ± 3	16,3 ± 3	16,9 ± 3	19,3 ± 3	19,8 ± 3	11 ± 3	15,4 ± 3	17 ± 3	15,9 ± 3	19 ± 3	20 ± 3	17,5 ± 3	20,5 ± 3
4	Salinidad (‰)	0,2 ± 0,06	0,4 ± 0,06	0,5 ± 0,06	0,4 ± 0,06	0,5 ± 0,06	0,4 ± 0,06	0,4 ± 0,06	0,4 ± 0,06	0,4 ± 0,06	0,3 ± 0,06	0,3 ± 0,06	0,3 ± 0,06	0,5 ± 0,06	0,4 ± 0,06	0,4 ± 0,06	0,4 ± 0,06
5	Color (u. de color)	303 ± 70	168 ± 70	247 ± 70	297 ± 70	314 ± 70	414 ± 70	233 ± 70	235 ± 70	222 ± 70	279 ± 70	144 ± 70	312 ± 70	222 ± 70	154 ± 70	259 ± 70	160 ± 70
6	Sólidos suspendidos totales (mg/l)	23 ± 10	13 ± 10	19 ± 10	20 ± 10	21 ± 10	20 ± 10	18 ± 10	19 ± 10	18 ± 10	21 ± 10	11 ± 10	24 ± 10	18 ± 10	13 ± 10	15 ± 10	18 ± 10
7	Conductividad (µS/cm)	413 ± 200	765 ± 200	778 ± 200	659 ± 200	844 ± 200	694 ± 200	721 ± 200	843 ± 200	661 ± 200	435 ± 200	466 ± 200	262 ± 200	863 ± 200	784 ± 200	668 ± 200	780 ± 200
8	Sólidos disueltos totales (mg/l)	242 ± 80	445 ± 80	465 ± 80	408 ± 80	498 ± 80	378 ± 80	394 ± 80	448 ± 80	447 ± 80	256 ± 80	267 ± 80	258 ± 80	498 ± 80	421 ± 80	452 ± 80	398 ± 80
9	Oxígeno disuelto (mg/l)	8 ± 1	-	-	7 ± 1	-	8 ± 1	-	-	7 ± 1	-	8 ± 1	-	8 ± 1	-	-	-
10	Nitrógeno amoniacal (mg/l)	0,04 ± 0,03	0,02 ± 0,03	0,08 ± 0,03	0,08 ± 0,03	0,03 ± 0,03	0,05 ± 0,03	0,08 ± 0,03	0,1 ± 0,03	0,02 ± 0,03	0,05 ± 0,03	0,02 ± 0,03	0,03 ± 0,03	0,06 ± 0,03	0,02 ± 0,03	0,02 ± 0,03	0,04 ± 0,03
11	DCO (mg/l)	10 ± 8	15 ± 8	15 ± 8	20 ± 8	25 ± 8	10 ± 8	15 ± 8	30 ± 8	15 ± 8	40 ± 8	15 ± 8	20 ± 8	25 ± 8	30 ± 8	35 ± 8	20 ± 8
12	DBO (mg/l)	5 ± 2	5 ± 2	7 ± 2	8 ± 2	8 ± 2	3 ± 2	4 ± 2	8 ± 2	6 ± 2	8 ± 2	5 ± 2	6 ± 2	8 ± 2	8 ± 2	8 ± 2	7 ± 2
13	Corofila a (µg/l)	45 ± 5	-	-	-	-	-	55 ± 5	-	-	-	-	-	49 ± 5	-	-	-
14	BHT (x10 ³ UFC/ml)	2,8 ± 2	-	1,8 ± 2	-	-	-	4,5 ± 2	-	-	-	3,4 ± 2	-	8,5 ± 2	-	-	1,3 ± 2
15	Coliformes totales (x10 ³ NMP/100 ml)	3,9 ± 9	-	-	-	-	-	9,3 ± 9	-	-	-	-	-	9,3 ± 9	-	-	-

Tabla 3.1. Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del agua del Río de la Plata entre los meses de julio a septiembre de 2018.

El pH, los metales y la materia orgánica son parámetros que pueden afectar la eficiencia de los productos molusquicidas (capítulo 1). Se encontró que el pH del agua de río durante el experimento tuvo un valor promedio de $7,5 \pm 0,5$; con un mínimo de 6,75 y un máximo de 8,67 unidades de pH. La efectividad como desinfectante del cloro disminuye a partir de pH 7,6 (Tchobanoglous y col., 2012), mientras que para el ácido peracético (activo B en el producto Sanurfloc Bioxi B) disminuye a valores de pH > 9 (Kitis, 2004; Luukkonen y col., 2014). Por lo tanto, el rango de pH observado en el agua de río, no afectará la eficiencia biocida del producto Sanurfloc Bioxi B, mientras que la eficiencia biocida del cloro será afectada. En relación a los metales presentes en el agua, se encontraron valores de concentración de hierro de $0,70 \pm 0,05$ mg/l y de manganeso de $0,06 \pm 0,01$ mg/l. En relación a la materia orgánica se obtuvieron valores de sólidos suspendidos totales en el rango de 11-24 mg/l y una DBO en el rango de 3-8 mg/l. Las concentraciones encontradas de metales y de materia orgánica así como la presencia de nitrógeno amoniacal en el agua ($0,02$ - $0,08$ mg/l) pueden generar una demanda de cloro. La demanda de cloro sobre el agua del Río de la Plata, tomó un valor de $4 \pm 0,5$ mg/l de cloro (Figura 3.1). Asimismo, la materia orgánica y los metales pueden generar una demanda de activo B, se determinó la demanda principio activo (activo B) de nuestro producto oxidante Sanurfloc Bioxi B y se obtuvo una concentración de $0,7 \pm 0,2$ mg/l de activo B.

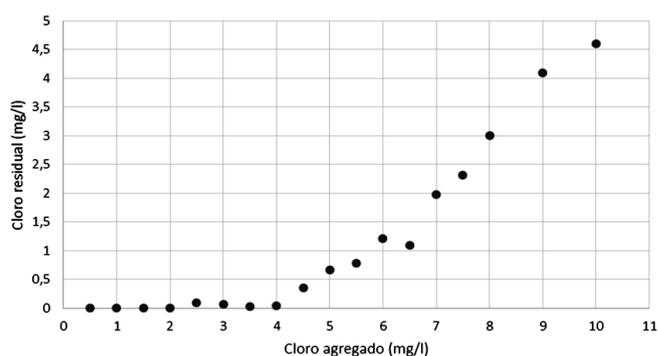


Figura 3.1. Demanda de cloro determinada sobre el agua del Río de la Plata. Se observa que en el agua de río, el cloro residual comienza a detectarse luego de la aplicación de 4 mg/l de cloro.

El pH, la temperatura, los metales pesados, la salinidad y el oxígeno disuelto son parámetros que pueden afectar la viabilidad del mejillón dorado (Tabla 1.1). El rango de pH del agua del Río de la Plata se encuentra dentro del rango aceptado (pH 6,5-8,5) para los distintos usos descriptos por la Secretaría de Recursos Hídricos Cuenca Del Plata:

USO I: agua para consumo humano con tratamiento convencional,

USO II: agua para actividades recreativas con contacto directo,

USO III: agua para actividades agropecuarias USO IV: protección de vida acuática).

Sólo en un muestreo de los 16 realizados se encontró un valor fuera del rango aceptado para los usos I-III (8,67).

La temperatura del agua del río tuvo un valor promedio de $17 \pm 2,4$ °C, la salinidad varió entre 0,2 y 0,5 ‰ y el oxígeno disuelto varió entre 7-8 mg/l, valores aceptables para el desarrollo de la vida del mejillón dorado (capítulo 1). Se encontraron valores de arsénico < 1 µg/l, de cromo $< 0,012$ mg/l y de plomo de 0,6 µg/l. Otros estudios informan contaminación de metales pesados en el agua del Río de la Plata, con valores en el rango de 0,2- 0,9 µg/l en las costas de Magdalena

y 0,9-21 $\mu\text{g/l}$ en las costas de Quilmes. Los valores descriptos de metales pesados no afectan al asentamiento y desarrollo del mejillón dorado (Serra y col., 1992; Evers y col., 1997; Bilos y col., 1998; Villar y col., 1999; Porta, 2001; Belaich y col., 2006).

El recuento de heterótrofas totales en el agua del río, arrojó valores entre $1,85 \times 10^3 - 8,5 \times 10^4$ UFC/ml y se obtuvieron valores de coliformes fecales entre 3900- 93000 NMP/100ml. El recuento de fitoplancton osciló entre $6,4 \times 10^3 - 147 \times 10^3$ células/ml (Figura 3.2).

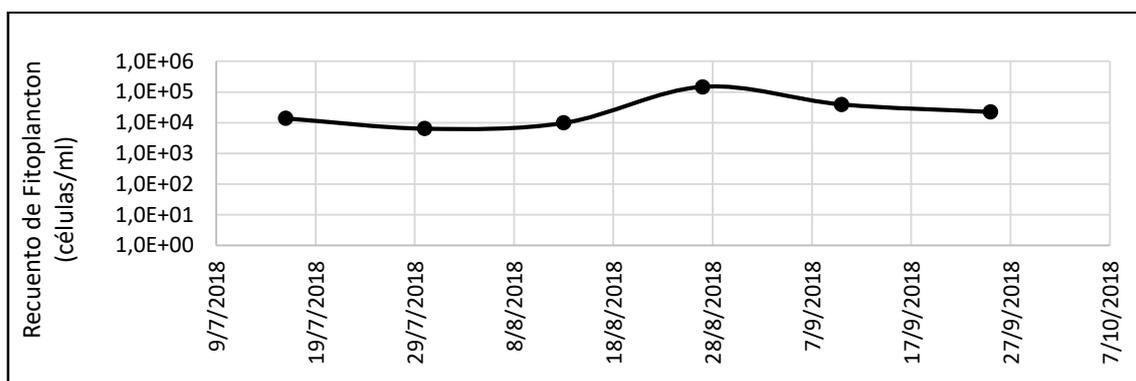


Figura 3.2. Recuento de fitoplancton del agua del Río de la Plata entre los meses de julio a septiembre de 2018. Los valores variaron entre 10^4-10^5 células/ml.

En la Figura 3.3 se observa la composición del fitoplancton, se observa un porcentaje mayor al 90 % de Chrysophyta. En la Tabla 3.2, se presenta los taxones encontrados en el agua del Río de la Plata.

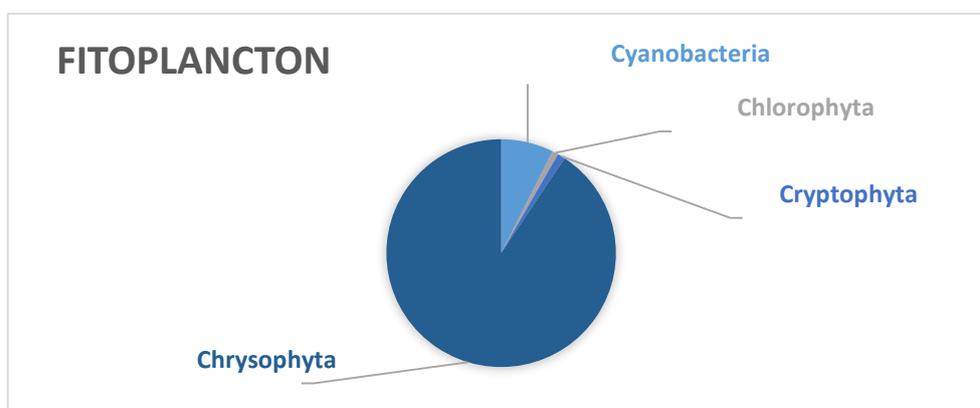


Figura 3.3. Fitoplancton presente en las muestras de agua del Río de la Plata, entre los meses de julio y septiembre de 2018: Chrysophyta 90,64±5 %, Cyanobacteria 7,40± 2 %, Cryptophyta 1,08± 0,05 % y Chlorophyta 0,87±0,01 %.

En el agua del Río de la Plata se encontró fitoplancton compuesto por especies que son consumidas por el mejillón dorado como *Monoraphidium* sp., *Scenedesmus* sp., *Selenastrum* sp., *Planktothrix* sp., *Pseudanabaena* sp. y diatomeas (Rückert y col., 2004; Pestana y col, 2009; Frau y col., 2013).

Fitoplancton		
Chlorophyta	Chlamydomonadales	<i>Sphaerocystis</i> sp.
	Chlorellales	<i>Actinastrum</i> sp.
		<i>Oocystis</i> sp.
	Sphaeropleales	<i>Ankistrodesmus</i> sp.
		<i>Coelastrum</i> sp.
		<i>Desmodesmus</i> sp.
		<i>Kirchneriella</i> sp.
		<i>Monoraphydium</i> sp.
		<i>Scenedesmus</i> sp.
		<i>Selenastrum</i> sp.
		<i>Tetraedron</i> sp.
Trebouxiophyceae ordo incertae sedis	<i>Crucigenia</i> sp.	
Cyanobacteria	Oscillatoriales	<i>Phormidium</i> sp.
		<i>Planktothrix</i> sp.
		<i>Pseudanabaena</i> sp.
	Chroococcales	<i>Chroococcus</i> sp.
		<i>Merismopedia</i> sp.
	Nostocales	<i>Raphidiopsis</i> sp.
Cryptophyta	Cryptomonadales	<i>Cryptomonas</i> sp.
		<i>Chroomonas</i> sp.
Chrysophyta	Diatomeas centrales	<i>Aulacoseira granulata</i>
		<i>Melosira</i> sp.
	Diatomeas pennadas	<i>Synedra</i> sp.

Tabla 3.2. Taxones encontrados en el agua del Río de la Plata entre los meses de julio y septiembre de 2018. Clasificación según Bourrelly (1972).

3.2. RESULTADOS DE LA PUESTA A PUNTO DE LA ACLIMATACIÓN

Las muestras de moluscos recibidas en el laboratorio se componían de diferentes tallas de mejillón dorado, en una proporción de 40 % de < 6 mm, 40 % de 6-15 mm y 20 % de 15-27 mm de longitud valvar. En relación a la aclimatación:

- En el primer grupo (< 6 mm), los mejillones lograron sobrevivir por más de dos meses en los acuarios, sin embargo, la observación de actividades tales como filtración, movilidad y adhesión fueron difíciles de evaluar macroscópicamente, debido a su pequeño tamaño.

- En el último grupo de mayor talla (15-27 mm), se observó una alta mortalidad durante la primera semana, posiblemente debido a la alta tasa de filtración correspondiente a organismos de mayor tamaño, que no fue compensada con una mayor frecuencia del recambio de agua de río y acentuada por la ausencia de aireación en el sistema.

- Los organismos de talla mediana (6-15 mm) lograron sobrevivir a las condiciones de laboratorio por más de dos meses y por ello fueron seleccionados para los ensayos.

La aclimatación se extendió durante 4 semanas y se obtuvo una mortalidad menor al 1%.

3.3. EFECTO DE SANURFLOC BIOXI B Y CLORO SOBRE LA MORTALIDAD DEL MEJILLON DORADO

3.3.1. La mortalidad del mejillón dorado bajo los tratamientos con cloro

En una primera etapa de este trabajo, se realizó la puesta a punto del ensayo de la eficiencia de los productos molusquicidas usando cloro:

Se estudió la mortalidad del mejillón dorado a fin de establecer el rango de dosis de cloro con eficiencia molusquicida. En esta fase exploratoria, las dosis de molusquicida utilizadas fueron 2,5; 5 y 10 mg/l de cloro, aplicado como hipoclorito de sodio comercial. Los resultados de la mortalidad a las distintas dosis evaluadas en nuestro laboratorio, luego de 30 días de ensayo, se presentan en la Figura 3.4. Se encontró que todas las dosis ensayadas de cloro, no mostraron efecto molusquicida durante los primeros 10 días de tratamiento, permaneciendo el porcentaje de mortalidad nulo. Tal como se observa en trabajos anteriores (Morton y col., 1976; Cataldo y col., 2003), los tratamientos a cortos tiempos con cloro no afectaron a los moluscos, probablemente por la capacidad de éstos de detectar el tóxico en el agua y cerrar fuertemente sus valvas, evitando así el contacto.

El tratamiento con 2,5 mg/l de cloro no mostró eficiencia molusquicida luego de un periodo de 30 días de contacto. Asimismo, este tratamiento no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) con el control sin molusquicida, alcanzando este último una mortalidad menor al 10 % luego de 30 días de ensayo. Los tratamientos con 5 y 10 mg/l de cloro, alcanzaron una mortalidad del 50 % a los 20-21 días y una mortalidad mayor al 90 % luego de 30 días de tratamiento, respectivamente.

La mortalidad del mejillón dorado bajo la aplicación de cloro, ha sido evaluada en trabajos anteriores. En los primeros estudios encontrados en la bibliografía, Morton y col. (1976) encontraron una mortalidad del 100 %, luego de 31 días de exposición con 1 mg/l de cloro a la temperatura de 20 ° C, sin embargo en ese experimento la mortalidad del control fue del 40 % luego de 24 días. Posteriormente, Cataldo y col. (2003) realizaron un estudio exhaustivo de la mortalidad del mejillón dorado en presencia del cloro, en sus experimentos utilizaron dosis de 1, 5, 10, 25, 50 y 100 mg/l, trabajando a tres temperaturas de ensayo 15, 20 y 25 ° C. La mortalidad del control no superó el 2 % en los ensayos a las diferentes temperaturas. Nuestros resultados son coincidentes a los encontrados en el trabajo Cataldo y col. (2003) como se observa en la Figura 3.5. Sin embargo, existen una diferencia importante en el diseño experimental, en nuestros experimentos se utilizó agua de río, con una demanda de cloro de $4 \pm 0,5$ mg/l, mientras que en el trabajo de Cataldo y col. se utilizó agua corriente declorada, como medio acuoso.

La diferencia entre el uso de agua declorada y agua de río como medio acuoso, debe tenerse en cuenta. El uso de agua de río respecto al agua declorada, puede implicar un aumento de la dosis de molusquicida, si se desea conseguir el mismo porcentaje de mortalidad (o efecto inhibitorio).

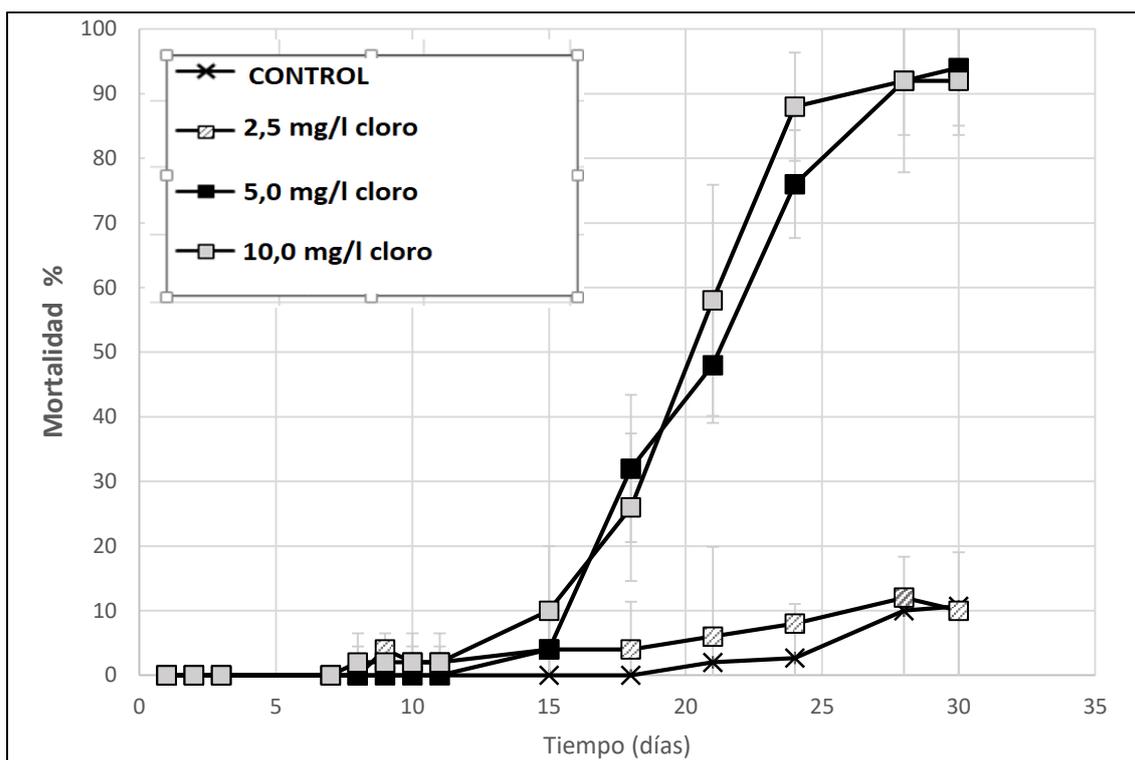


Figura 3.4. Mortalidad de *L. fortunei*, bajo los tratamientos de 2,5; 5 y 10 mg/l de cloro, a la temperatura de 20 °C utilizando agua de río como medio acuoso e individuos de longitud valvar de 6-15 mm. Cada punto es un valor promedio de 5 réplicas en el ensayo, las barras de error representan la desviación estandar.

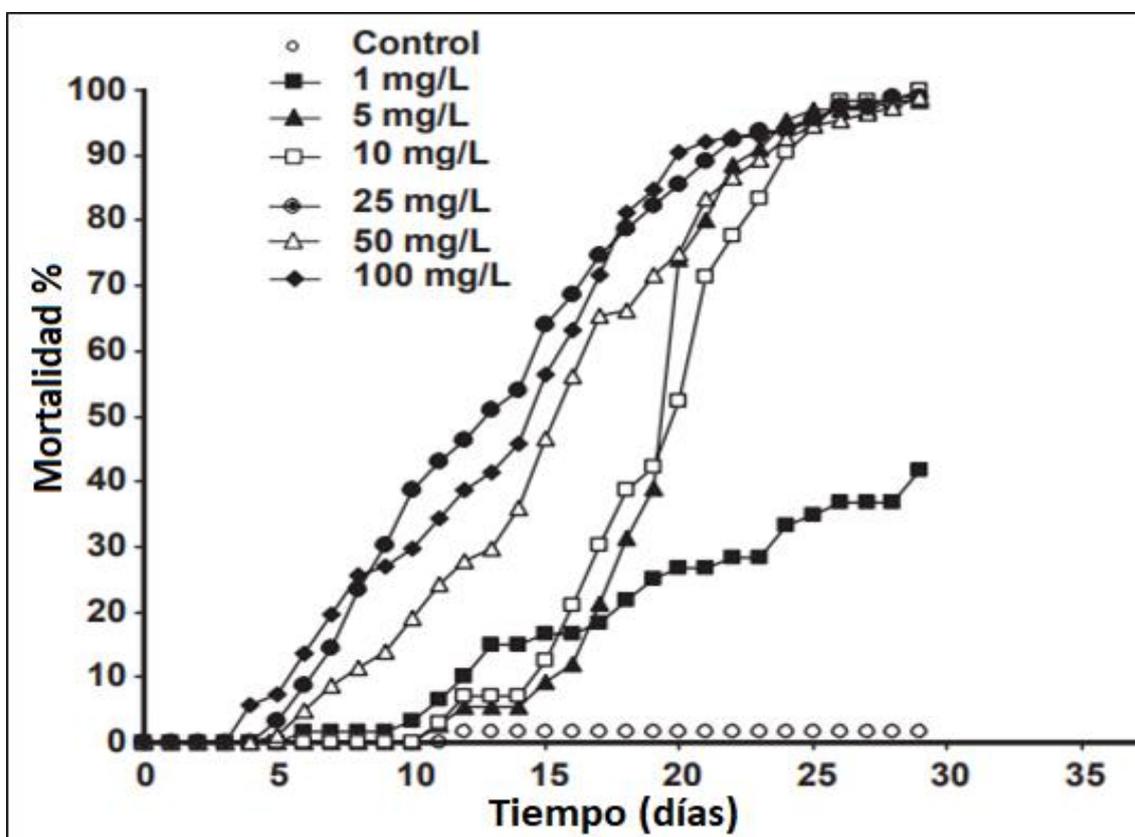


Figura 3.5. Cataldo y col. 2003. Mortalidad de *L. fortunei*, bajo los tratamientos de 1, 5, 10, 25, 50 y 100 mg/l de cloro, a la temperatura de 20 °C utilizando agua de clorada como medio acuoso e individuos de longitud valvar de 15- 25 mm. Cada punto es un valor promedio de 3 réplicas en el ensayo.

Por otra parte, en el trabajo de Cataldo y col. (2003), se utilizaron mejillones dorados de 15-25 mm de longitud valvar, mientras que en nuestro estudio el tamaño fue menor (6-15 mm). Es importante destacar que individuos de menor tamaño son más sensibles a los tóxicos, esto es debido a su menor peso corporal y a la mayor tasa de filtración en relación al peso del individuo que presentan los mejillones más jóvenes (Sylvester, 2006).

Se evidencia que las curvas de mortalidad obtenidas en el presente trabajo (Figura 3.4) y en el trabajo de Cataldo y col. (2003), presentan resultados comparables. Los controles presentan una mortalidad muy baja tomando valores $< 10\%$ en nuestro estudio y $< 2\%$ en el trabajo de los autores, luego de 30 días de contacto. Para las dosis evaluadas de 5 y 10 mg/l de cloro se encontró que el tiempo para lograr el 50 % de mortalidad es alrededor de 20 días, mientras que se alcanza una mortalidad mayor al 90 % luego de 25 a 30 días. Estos resultados son coincidentes en ambos estudios.

La evaluación de la eficiencia molusquicida del cloro en este trabajo y la repetitividad que ha mostrado con el trabajo de Cataldo y col. (2003) nos permitió establecer una metodología apropiada para la evaluación de otros productos de interés con efectos molusquicidas.

Al finalizar esta etapa exploratoria, se determinó la dosis óptima, definida como la menor dosis que permite el mayor porcentaje de mortalidad en el menor tiempo. En relación al cloro se seleccionó la dosis de 5 mg/l, con la cual se alcanzó una mortalidad mayor al 90 % en 30 días. Mientras que en dosis menores no se alcanza el 90% de mortalidad en 30 días. Este resultado es el mismo encontrado por Cataldo y col. (2003).

En una segunda etapa de este trabajo, se evaluó la efectividad molusquicida utilizando diferentes concentraciones de cloro y de Sanurfloc Bioxi B en forma individual, con mejillones dorados obtenidos en un mismo muestreo. En la Figura 3.6, se observa la mortalidad del mejillón dorado en función del tiempo a las diferentes dosis de cloro, a la temperatura de trabajo de 20°C en agua de río. Se observa que el 50 % de mortalidad de los moluscos se alcanza a los 17 días con 5 mg/l de cloro, a los 29 días con 2,5 mg/l de cloro y no alcanza el 50 % de mortalidad con la dosis de 1,25 mg/l de cloro. Por otra parte, la mortalidad máxima se alcanza luego de 48 días de tratamiento, obteniendo una mortalidad de 100 % con 5 mg/l de cloro. Luego de 60 días de tratamiento se alcanza una mortalidad de 94 % con 2,5 mg/l de cloro y de 28 % con 1,25 mg/l de cloro.

En esta segunda evaluación se observa un efecto en la mortalidad del mejillón dorado bajo la dosis de 2,5 mg/l, mientras que en la primera evaluación no se observó un efecto marcado. En la puesta a punto de la técnica se obtuvo una mortalidad de $10\% \pm 14\%$ y en el ensayo siguiente se obtuvo una mortalidad de $54\% \pm 20\%$, luego de 30 días de contacto. Dado que ambos ensayos utilizaron mejillones y agua de muestreos diferentes, la diferencia encontrada puede deberse al estado fisiológico de los mejillones dorados previo a su recolección, y también a la calidad del agua utilizada, que puede tomar valores diferentes de demanda de cloro.

En la Tabla 3.3 se presentan los resultados de mortalidad del cloro sobre el mejillón dorado expresados como DL50 obtenidos en el trabajo de Cataldo y col. (2003) que empleo agua de clorada, y los resultados obtenidos en este trabajo utilizando mejillones inmersos en agua de río. En el presente trabajo, entre los días 20 y 21 se obtiene el valor de DL50 de 3,3 mg/l de cloro. En el trabajo de los autores, se observa que para un mayor tiempo de contacto, 25 días, el valor de DL50 es menor y toma un valor de 1,2 mg/l. Esta reducción en la dosis también se observa en nuestros resultados tomando un valor de 2,58 mg/l de cloro en el día 27 del experimento (Tabla 3.3)

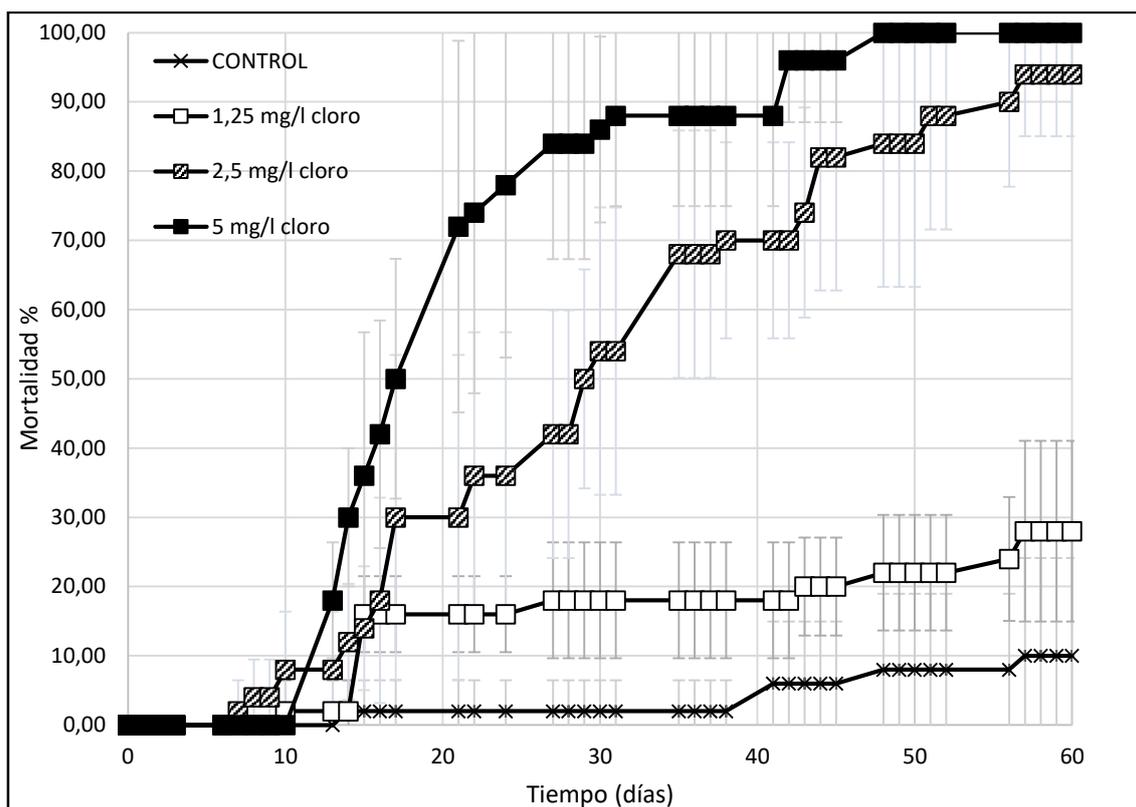


Figura 3.6. Mortalidad de *L. fortunei*, bajo los tratamientos de 1,25; 2,5 y 5 mg/l de cloro, a la temperatura de 20 °C utilizando agua de río como medio acuoso e individuos de longitud valvar de 6- 15 mm. Cada punto es un valor promedio de 5 réplicas en el ensayo, las barras de error representan la desviación estándar.

Tiempo de contacto	CLORO. Dosis letal 50 (DL50) (mg/l) a la temperatura de 20°C	
	Cataldo y col. (2003), agua de clorada, longitud valvar 15-25 mm	Este trabajo, agua de río longitud valvar 6-15 mm
17 días	-----	5,1 ± 0,2
20 días	3,3	-----
21 días	-----	3,3 ± 0,1
25 días	1,2	-----
27 días	-----	2,58 ± 0,09

Tabla 3.3. Comparación de las dosis letal 50 (DL50) del mejillón dorado a la temperatura de 20°C, Cataldo y col. (2003), y en el presente trabajo.

3.3.2. La mortalidad del mejillón dorado bajo los tratamientos con Sanurfloc Bioxi B

La mortalidad del mejillón dorado bajo los efectos del producto Sanurfloc Bioxi B o producto similares que contengan como principio activo el ácido peracético, no ha sido evaluada en trabajos anteriores. En este trabajo se abordó el estudio de la mortalidad del molusco, utilizando la misma metodología empleada para la evaluación del cloro, anteriormente descrita.

En la Figura 3.7, se observa la mortalidad del mejillón dorado en función del tiempo a las distintas dosis de activo del producto Sanurfloc Bioxi B (activo B) empleadas. Durante los primeros 10 días de contacto no se evidencia mortalidad, a ninguna de las dosis ensayadas. Este resultado es el mismo que el observado bajo el tratamiento con cloro (Figura 3.6). La mortalidad del mejillón dorado bajo los tratamientos en dosis bajas (0,75 y 1,5 mg/l de activo B) de Sanurfloc

Bioxi B no mostró diferencias significativas con la mortalidad en el control ($p > 0,05$). No se observó efectos en la mortalidad del molusco, bajo las dosis de 0,75 y 1,5 mg/l de activo B luego de 60 días de tratamiento. Dado que la demanda de activo B fue de 0,7 mg/l, es posible que el agua de río consuma todo el oxidante o bien permanezca remanente una dosis muy baja de activo B, la cual no tiene efecto sobre la mortalidad de los mejillones.

A pesar que en la Figura 3.7 la menor dosis de Sanurfloc Bioxi B a la cual se observa mortalidad del molusco es 3,75 mg/l de activo B, y que alcanza luego de 60 días de aplicación el 35% de mortalidad. El análisis estadístico indicó que a esta dosis no existen diferencias significativas en la mortalidad con relación al tratamiento control ($p= 0,13$). Podemos definir entonces como nivel de efecto adverso no observado (NOAEL) a la dosis de 3,75 mg/l.

Por otra parte, la mortalidad entre la dosis de 7,5 mg/l y el control sin molusquicida, luego de 30 y 60 días, muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Podemos definir entonces como dosis umbral, mínima dosis que muestra efectos sobre la mortalidad el bivalvo, al valor de 7,5 mg/l de activo B, entre las dosis ensayadas en este estudio. Debido a que no se evaluó la mortalidad en dosis intermedias entre 3,75 y 7,5 mg/l de activo B, es posible que la dosis umbral en 30 y 60 días sea menor a 7,5 mg/l de activo B.

Se observó que se alcanza una mortalidad del 50 % con 30 mg/l de activo B a los 30 días, con 15 mg/l de activo B a los 33 días, con 7,5 mg/l de activo B a los 43 días y no se alcanza el 50 % de mortalidad con la dosis de 3,75 mg/l de activo B.

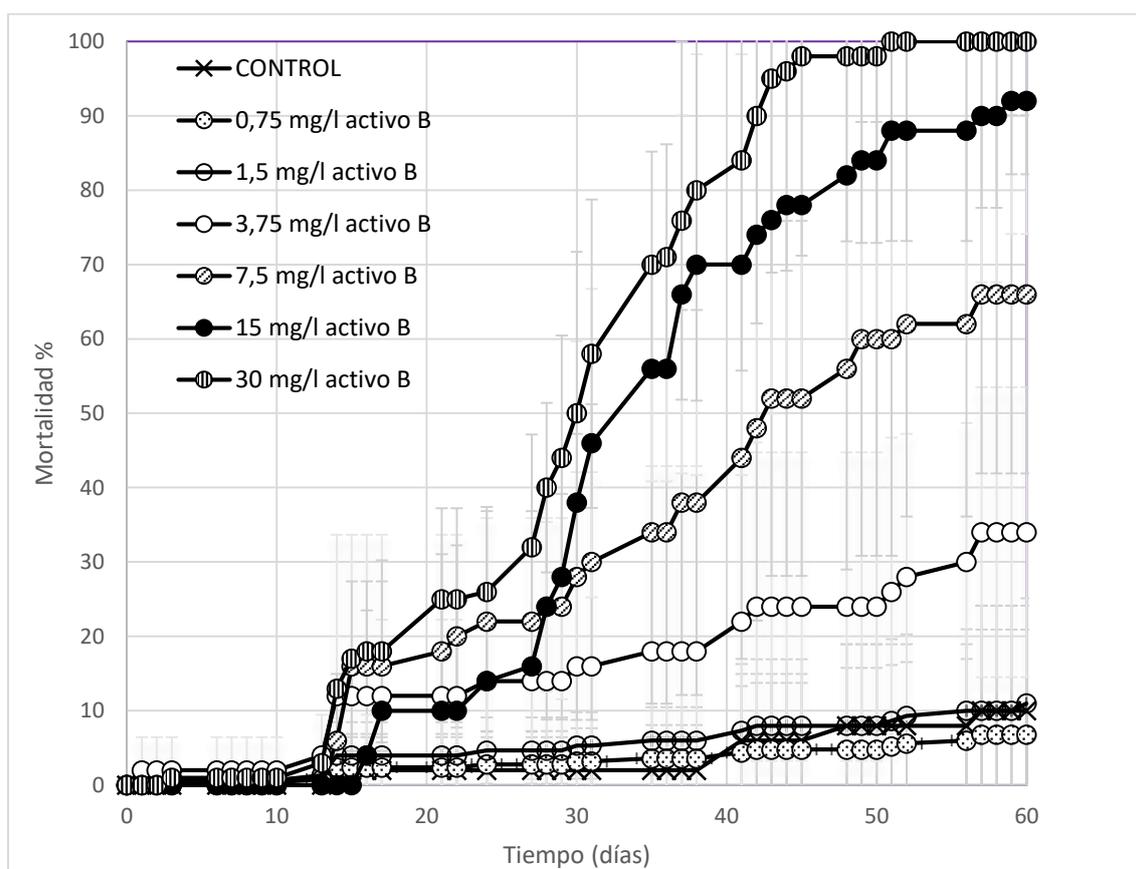


Figura 3.7. Mortalidad de *L. fortunei*, bajo los tratamientos de 0,75;1,5; 3,75; 7,5;15 y 30 mg/l de activo B (activo del producto Sanurfloc Bioxi B), a la temperatura de 20 °C utilizando agua de río como medio acuoso e individuos de longitud valvar de 6- 15 mm. Cada punto es un valor promedio de 5 réplicas en el ensayo, las barras de error representan la desviación estándar.

En relación a los valores máximos de mortalidad, se alcanza una mortalidad del 100 % con 30 mg/l de activo B luego de 51 días de contacto, con las dosis 15; 7,5 y 3,75 mg/l de activo B se alcanza una mortalidad de 92 %, 66% y 34 % respectivamente, luego de 60 días de tratamiento. Mientras que las dosis más bajas y el control sin molusquicida no superan el 10 % de mortalidad, luego de 60 días de tratamiento.

La dosis óptima de este producto fue de 15 mg/l porque alcanza una mortalidad del 92% a los 60 días.

Cabe destacar que las curvas de mortalidad del mejillón dorado presentadas fueron realizadas sobre agua de río con una demanda de activo B de 0,7 mg/l, la misma agua presenta una demanda de cloro de 4 mg/l. Por lo tanto, es probable que la dosis de Sanurfloc Bioxi B a aplicar para obtener los mismos porcentajes de mortalidad, sea menor en aguas tales como: agua corriente declarada, aguas tratadas mediante floculación-coagulación o previamente tratadas con cloro.

3.3.3. Comparación de la Dosis letal 50 (DL50) de activo B (activo de Sanurfloc Bioxi B) y cloro a distintos tiempos de contacto sobre el mejillón dorado

La dosis letal 50 (DL50) de activo B (activo de Sanurfloc Bioxi B) y de cloro, para el mejillón dorado fue determinada para diferentes tiempos de contacto, en un rango de 17 a 60 días. Se utilizó el análisis probit. En la Figura 3.8 y 3.9, se observa el porcentaje de mortalidad (en unidades probits) frente al logaritmo decimal de la dosis de cloro y activo B respectivamente, para los tiempos de contacto de 17, 21, 27, 30, 40, 50 y 60 días. Se observa que al aumentar el tiempo de contacto el valor de las pendientes de las curvas de regresión lineal se incrementan (Tabla 3.4 y 3.5). El valor de DL50 se obtiene a partir de la regresión lineal determinando la dosis para un valor de probit de 5 que corresponde a un 50 % de mortalidad. Los resultados se presentan en la Tabla 3.4 para el cloro y en la Tabla 3.5 para el activo B. Podemos observar que al aumentar el tiempo de contacto, el valor de DL50 de activo B disminuye exponencialmente mientras que el valor de DL50 de cloro disminuye linealmente (Tabla 3.6).

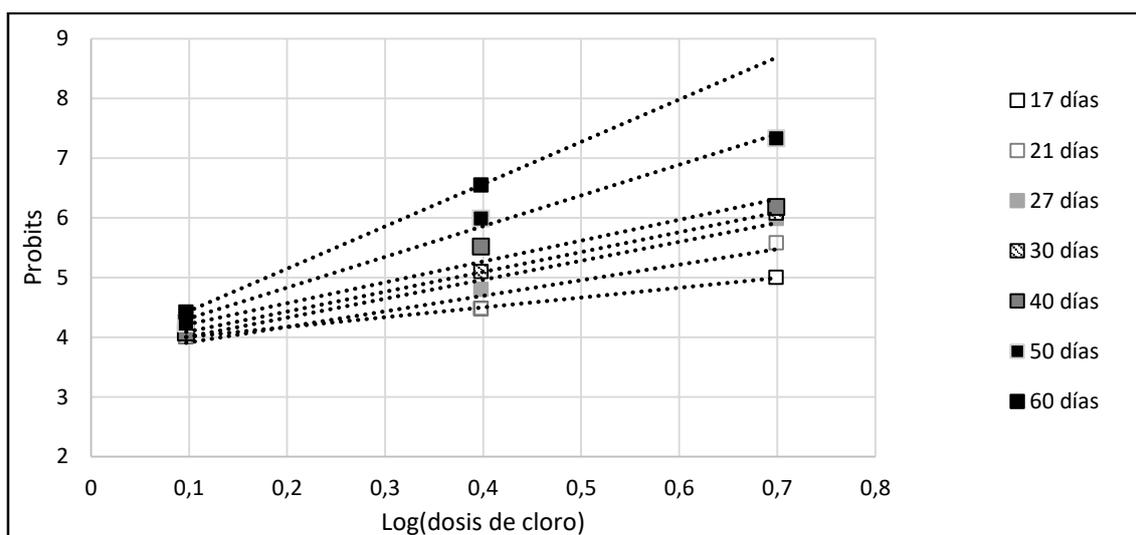


Figura 3.8. Curvas mortalidad de *L. fortunei* (probits) frente al log(dosis) de cloro para diferentes tiempos de contacto.

Tiempo de contacto cloro	Regresión lineal	R ²
17 días	Log(dosis)=1,6444 x (probits) +3.8423	0.9992
21 días	Log(dosis)=2,6077 x (probits) +3.6523	0.9491
27 días	Log(dosis)=3,1724 x (probits) +3.6942	0.9802
30 días	Log(dosis)=3,3219 x (probits) +3.7647	0.9999
41 días	Log(dosis)=3,4840 x (probits) +3.8820	0.9560
50 días	Log(dosis)=5,1490 x (probits) +3.8010	0.9939
60 días	Log(dosis)=7,0756 x (probits) +3.7343	1,0000

Tabla 3.4. Ecuación de regresión lineal de Curvas mortalidad de *L. fortunei* (probits) frente al log(dosis) de cloro para diferentes tiempos de contacto.

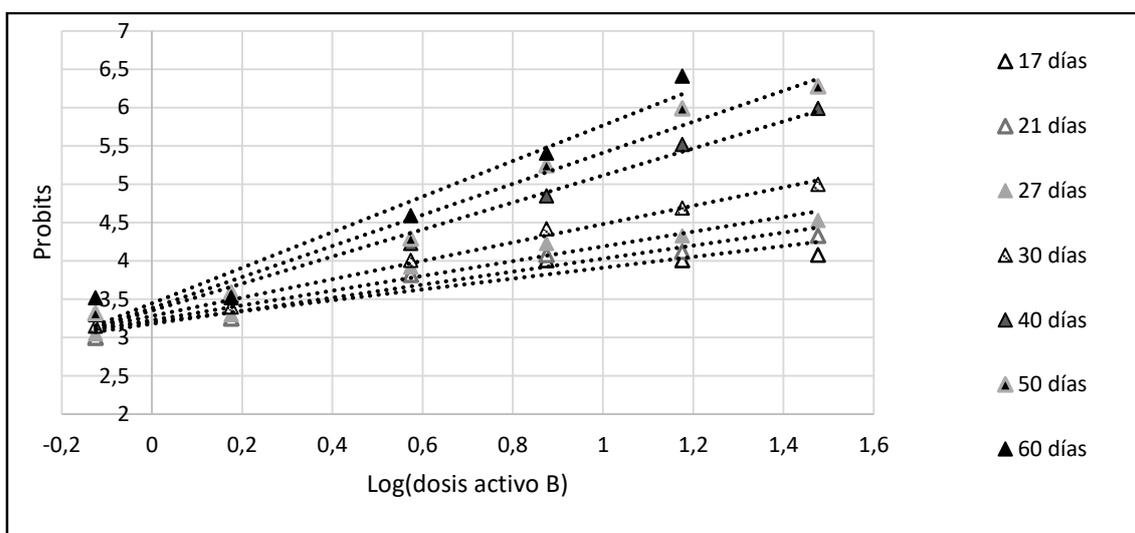


Figura 3.9. Curvas mortalidad de *L. fortunei* (probits) frente al log(dosis) de activo B de Sanurfloc Bioxi B para diferentes tiempos de contacto.

Tiempo de contacto Sanurfloc Bioxi B	Regresión lineal	R ²
17 días	Log(dosis)=0.7070 x (probits) +3.2056	0.8775
21 días	Log(dosis)=0.8502 x (probits) +3.1781	0.9471
27 días	Log(dosis)=0.9635 x (probits) +3.2264	0.9588
30 días	Log(dosis)=1.7633 x (probits) +3.3527	0.9877
41 días	Log(dosis)=1.2003 x (probits) +3.2858	0.9920
50 días	Log(dosis)=2.0275 x (probits) +3.3831	0.9751
60 días	Log(dosis)=2.3210 x (probits) +3.4477	0,9455

Tabla 3.5. Ecuación de regresión lineal de Curvas mortalidad de *L. fortunei* (probits) frente al log(dosis) de activo B de Sanurfloc Bioxi B para diferentes tiempos de contacto.

Tiempo de contacto	Dosis letal 50 (DL50) a la temperatura de 20°C	
	ACTIVO B (mg/l).	CLORO (mg/l)
17 días	345,2 ± 0,4	5,1 ± 0,2
21 días	139,0 ± 0,31	3,3 ± 0,1
27 días	69,3 ± 0,31	2,58 ± 0,09
30 días	27,0 ± 0,2	2,35 ± 0,09
41 días	8,6 ± 0,21	2,09 ± 0,08
50 días	6,3 ± 0,1	1,71 ± 0,05
60 días	4,7 ± 0,1	1,51 ± 0,04

Tabla 3.6. Dosis letal 50 (DL50) de *L. fortunei* a la temperatura de 20°C, bajo tratamiento con activo B de Sanurfloc Bioxi B y cloro para el mejillón dorado, en agua de río para diferentes tiempo de contacto.

Los datos de la tabla 3.6 se presentan en la Figura 3.10. El análisis de los valores experimentales evidencia que a tiempos largos de tratamiento las dosis de activo B a aplicar se reducen a niveles equivalentes a las dosis de cloro. Por lo tanto, es probable que la aplicación continua en plantas de tratamiento a bajas dosis de Sanurfloc Bioxi B, genere una protección contra la incrustación de los bivalvos equivalente a la proporcionada por el cloro.

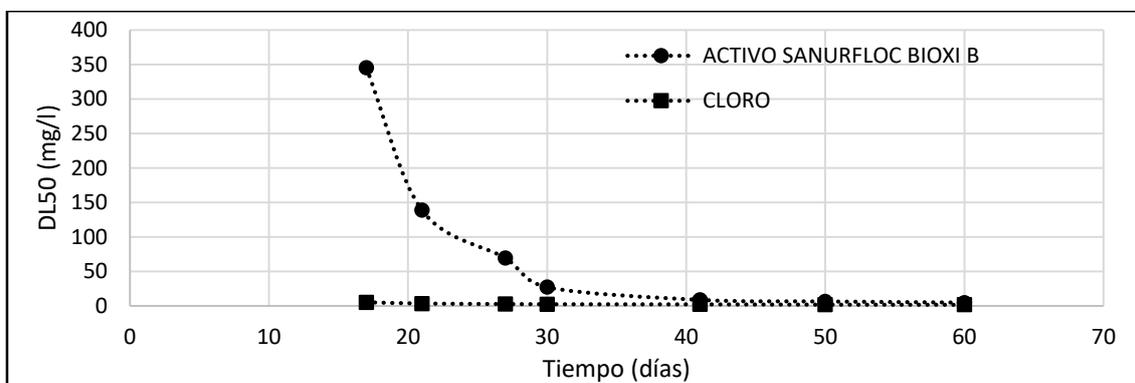


Figura 3.10. Variación de la Dosis letal 50 (DL50) de *L. fortunei* frente al tiempo de contacto, bajo el tratamiento con activo B y el cloro en agua de río, a la temperatura de 20° C.

3.3.4. Análisis de la mortalidad del mejillón dorado bajo la combinación secuencial de Sanurfloc Bioxi B y cloro.

La dosis óptima del molusquicida es la menor dosis que permite el mayor porcentaje de mortalidad en el menor tiempo:

-En relación al cloro se seleccionó la dosis de 5 mg/l, con la cual se alcanzó una mortalidad mayor al 90 % en 30 días en el primer ensayo y una mortalidad del 100 % a los 48 días en el segundo ensayo (Figura 3.6). En relación a la dosis de 2,5 mg/l de cloro, se obtuvo diferentes resultados entre el primer ensayo, donde no se observó un efecto molusquicida marcado y el segundo ensayo donde se observó una mortalidad mayor al 50% a los 30 días y una mortalidad del 94% a los 60 días. Por esta variabilidad, se seleccionó la dosis de 5 mg/l de cloro que tuvo un comportamiento similar en ambos ensayos.

-En relación al producto Sanurfloc Bioxi B se seleccionó como dosis óptima 15 mg/l de activo B, con la cual se alcanzó una mortalidad del 50 % a los 31 días de contacto y una mortalidad mayor al 90 % en 60 días (Figura 3.7). Por otro lado, la dosis de 30 mg/l de activo B, que alcanzó una mortalidad del 50 % a los 30 días de contacto y una mortalidad 100 % en 51 días de contacto, se

descartó como dosis óptima. Primero, porque los valores experimentales muestran que con una dosis de 30 mg/l de activo B se alcanza el 50 % de mortalidad a los 30 días mientras que con la mitad de la dosis, 15 mg/l de activo B, se alcanza el 50 % de mortalidad a los 31 días, como ambas dosis alcanzaron un 50% de mortalidad con una mínima diferencia de tiempo, se seleccionó la menor dosis. Segundo, se consideró que a tiempos largos de contacto el valor de la DL50 disminuye exponencialmente (Figura 3.10), dado que nuestro ensayo tiene una duración de 60 días de tratamiento, la dosis más baja es más conveniente. Tercero, debido al costo del producto superior al del cloro, es importante seleccionar la menor dosis factible de aplicar. Cuarto, siempre es conveniente utilizar la menor dosis a fin de evitar el efecto del producto sobre otras especies y su difusión en el medio ambiente.

En la Figura 3.11, se observa la mortalidad del mejillón dorado en función del tiempo bajo los distintos tratamientos empleados (Tabla 2.4). Se observa que el 50 % de mortalidad de los moluscos se alcanza a los 21, 29 y 34 días con los tratamientos 4, 5 y 6 (ver tabla 2.4). En relación a los valores máximos de mortalidad, luego de 41 días de tratamiento se alcanzó una mortalidad de 100 % con la combinación 3,75 mg/l activo B y 3,75 mg/l cloro (tratamiento 4). Luego de 42 días de tratamiento se alcanza una mortalidad de 98 % con la combinación de 7,5 mg/l activo B y 2,5 mg/l cloro (tratamiento 5) que se mantiene constante hasta los 60 días de tratamiento. Finalmente se alcanza una mortalidad de 84 % con la combinación de 11,25 mg/l activo B y 1,25 mg/l cloro (tratamiento 6).

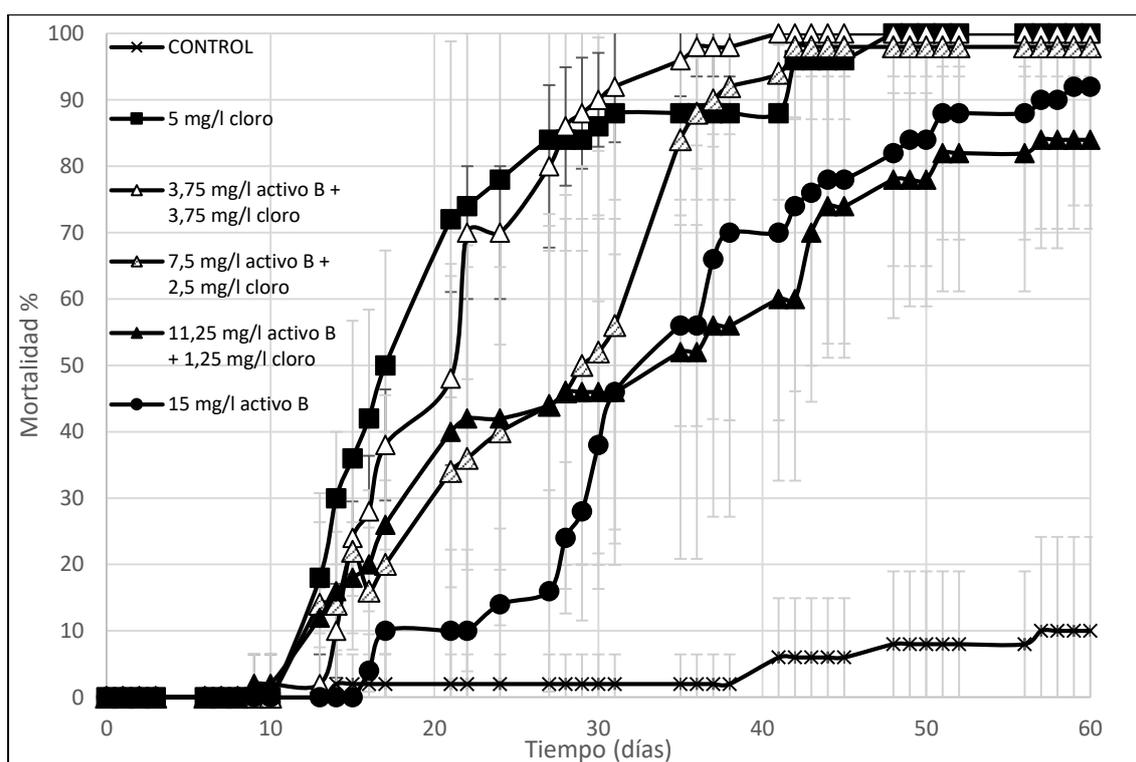


Figura 3.11. Mortalidad de *L. fortunei*, bajo los tratamientos combinados 25:75; 50:50 y 75:25 de activo B: cloro en dosis de 15 mg/l de activo B (activo de Sanurfloc Bioxi B) y 5 mg/l de cloro. Como control se utilizó 15 mg/l de activo B y 5 mg/l de cloro, y una condición sin molusquicida (control). A la temperatura de 20 °C utilizando agua de río como medio acuoso e individuos de longitud valvar de 6- 15 mm. Cada punto es un valor promedio de 5 réplicas en el ensayo, las barras de error representan la desviación estándar.

En la Figura 3.12 se presenta el tiempo requerido para alcanzar el 50% de mortalidad bajo los diferentes tratamientos (Tabla 2.4). El cloro es el más efectivo como molusquicida, alcanza una mortalidad del 50%, a una dosis de 5 mg/l de cloro en 17 días y a 2,5 mg/l de cloro en 29 días.

Por otra parte, la combinación más efectiva fue la mezcla de 3,75 mg/l de activo B + 3,75 mg/l de cloro (tratamiento 4), que alcanza una mortalidad del 50%, en el tiempo de 21 días. Sin embargo, el valor DL50 de cloro para 21 días es de 3,3 mg/l, por lo tanto el efecto observado se debe solamente a la dosificación de cloro. El mismo efecto se observa al analizar los resultados de la combinación de 7,5 mg/l de activo B + 2,5 mg/l de cloro (tratamiento 5), con la cual se alcanza una mortalidad del 50%, a los 29 días, mientras que la aplicación de 2,5 mg/l de cloro también alcanza una mortalidad del 50%, a los 29 días. Por lo tanto, la adición del producto Sanurfloc Bioxi B a los tratamientos con cloro no disminuye el tiempo de contacto para alcanzar el 50 % de mortalidad el mejillón dorado.

El producto Sanurfloc Bioxi B, alcanza una mortalidad del 50 %, a una dosis de activo B de 15 mg/l en 33 días y a 7,5 mg/l en 43 días. Mientras que la combinación entre 11,25 mg/l de activo B + 1,25 mg/l de cloro (tratamiento 6), alcanza una mortalidad del 50 % a los 34 días, un tiempo similar al obtenido bajo el tratamiento con 15 mg/l de activo B. Debido a que no se ensayó la mortalidad en función del tiempo a la dosis de 11,25 mg/l de activo B, no se contó con el dato del tiempo requerido para alcanzar el 50 % de mortalidad. Sin embargo este valor pudo estimarse. El valor calculado de DL50 para 36 y 37 días es 12,5 y 10,0 mg/l de activo B de Sanurfloc Bioxi B respectivamente, por lo tanto, para una dosis intermedia de 11,25 mg/l de activo B, el tiempo requerido para alcanzar el 50 % de mortalidad es aproximadamente 36,5 días.

Entonces, si para alcanzar una mortalidad del 50 % se requiere una dosis de 15 mg/l de activo B durante 33 días, una dosis de 11,25 mg/l de activo B durante 36,5 días y la combinación cuya composición es 11,25 mg/l de activo B + 1,25 mg/l de cloro, durante 34 días, podemos estimar que la reducción de 36,5 a 34 días es debido a la adición de cloro. Esta situación, nos brinda la ventaja de poder reducir un 25 % la aplicación de producto Sanurfloc Bioxi B y reemplazarlo por 1,25 mg/l de cloro, más económico. Mientras que en dosis de 1,25 mg/l de cloro no se alcanza el 50 % de mortalidad durante los 60 días de experimento. Se observa que para 3,75 mg/l de activo B tampoco se alcanza el 50 % de mortalidad durante los 60 días de experimento.

Los resultados encontrados sobre la mortalidad del mejillón dorado bajo los tratamientos combinados, muestran que a tiempos cortos, 17 a 21 días, el efecto del cloro es predominante frente al efecto del activo B. Mientras que a un plazo más largo 33 a 43 días, se observa el efecto del activo B y se observa un posible efecto de adición entre los dos molusquicidas.

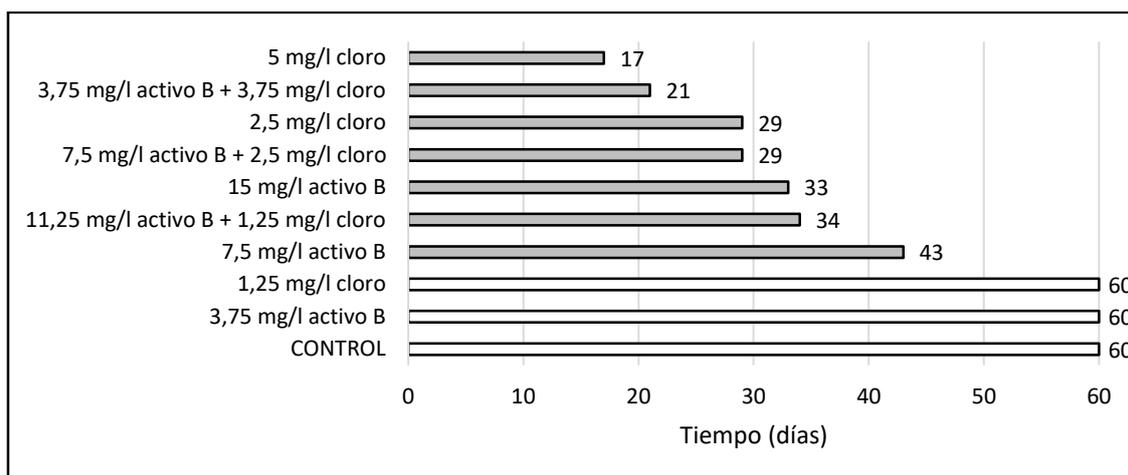


Figura 3.12. Tiempo para alcanzar el 50 % de mortalidad de *L. fortunei*, bajo los diferentes tratamientos. Las barras blancas indican que no se alcanza el 50 % de mortalidad a los 60 días.

3.4. EFECTOS DE SANURFLOC BIOXI B, CLORO Y SUS COMBINACIONES SOBRE LA MOVILIDAD: CAPACIDAD DE ASCENSO SOBRE SUSTRATO

Los mejillones dorados pueden ascender sobre un sustrato vertical solamente mediante locomoción a través del pie (Figura 3.13), para lo cual deben abrir las valvas y exponer el pie al medio acuoso. Uryu y col. (1996) e Iwasaki (1997) describieron el "comportamiento de escalada" de *L. fortunei* como un movimiento de arrastre ascendente a lo largo de las paredes internas de los buques experimentales (acuarios).

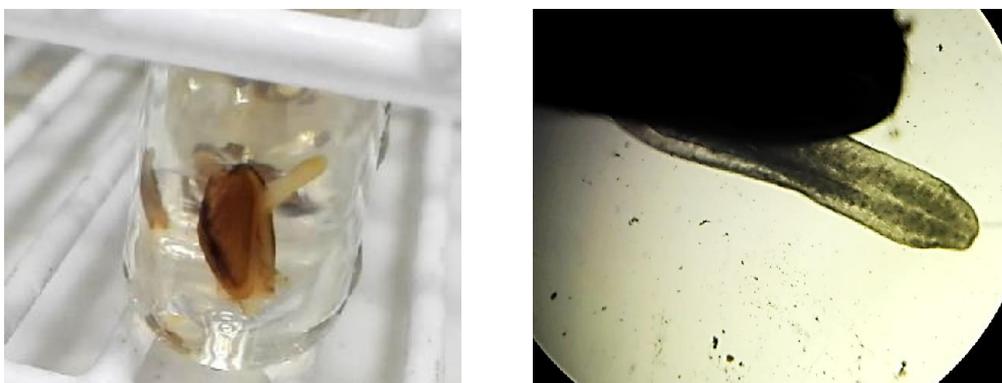


Figura 3.13. Pie de *L. fortunei*. En la izquierda se presenta el mejillón dorado exponiendo el pie adherido al vidrio de un tubo de ensayo, a la derecha se observa el pie del mejillón dorado *in vivo* visto en microscopio invertido con un aumento de 40X. Fotografía: Lic. Virginia Martínez

3.4.1. Capacidad de ascenso del mejillón dorado

En la Figura 3.14 se presentan los resultados del valor H% en función del tiempo para el mejillón dorado en los **ensayos de ascenso número 1 y 2** (ver 2.6 de Materiales y métodos). Se observa que el valor de H obtenido durante todo el experimento a 30 días, no superó el 20 %, mientras que en el ensayo de 60 días, no superó el 10 %. Estos resultados muestran que los mejillones dorados prefieren la ubicación en el fondo del acuario frente a ubicaciones a mayor altura. No existen diferencias significativas entre los porcentaje de ascenso de los ensayos de ascenso número 1 y 2 ($p > 0,05$), por lo tanto, no existen diferencias entre el comportamiento de los mejillones muestreados en febrero y los muestreados en junio del 2018. En el estudio de Iwasaki

(1997), se utilizaron 200 mejillones dorados ubicados en acuarios con 10 cm de altura de columna de agua en total oscuridad, y se encontró que el 29 % de los animales ascendieron, de los cuales el 37 % se ubicó por debajo de la interfaz agua aire, entre los 9-10 cm de altura. Asimismo, el autor indica que los moluscos han mostrado una geotaxis positiva en presencia de luz. Por lo tanto, podemos concluir que la geotaxis positiva es congruente con nuestros resultados, bajo con un fotoperiodo de 8 horas de luz y 16 de oscuridad.

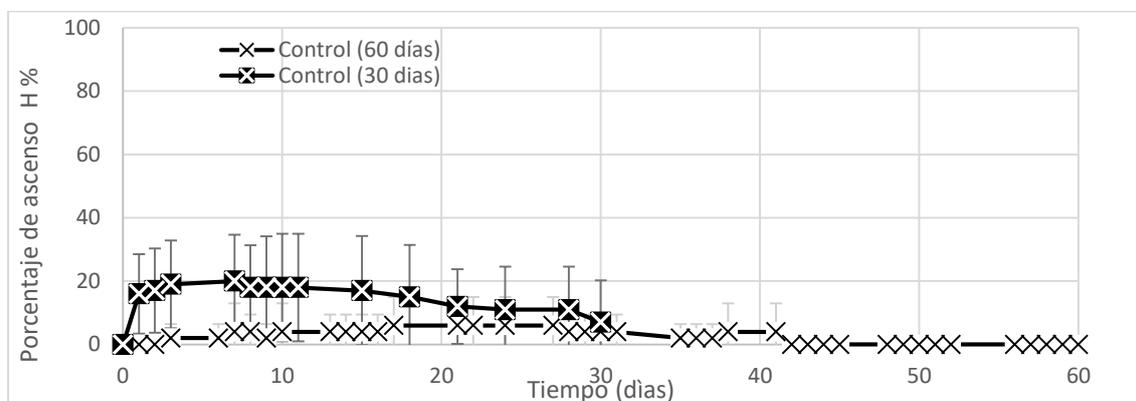


Figura 3.14. Porcentaje de ascenso H% de *L. fortunei* frente al tiempo, para el Ensayo ascenso número 1 (30 días, 15 réplicas, n=150 individuos) y para el Ensayo ascenso número 2 (60 días, 5 réplicas, n=50 individuos), se trabajó a la temperatura de 20 °C utilizando agua de río como medio acuoso e individuos de longitud valvar de 6- 15 mm. Las barras de error representan la desviación estándar.

3.4.2. Efectos del producto Sanurfloc Bioxi B, cloro y sus combinaciones sobre la capacidad de ascenso del mejillón dorado

Existen dos escenarios posibles frente a la aplicación de molusquicidas sobre el medio acuoso, por un lado los molusquicidas pueden promover la relocalización del mejillón dorado a otro sitio sin el tóxico, por lo tanto es de esperar que los individuos asciendan hasta la superficie del líquido, ubicándose a la altura de 10 cm en la interfaz aire-agua. En la otra situación posible, el mejillón puede evitar abrir las valvas para no entrar en contacto con el molusquicida, sin exponer pie, con lo cual no se observaría ascenso sobre el sustrato. Otra forma de corroborar la segunda situación, es evaluando la adhesión, para lo cual el molusco debe exponer el pie y segregar hilo bisal, si el organismo se encuentra adherido entonces ha expuesto su pie al medio acuoso.

Se evaluó el efecto de los tratamientos con Sanurfloc Bioxi B, cloro y sus combinaciones sobre la capacidad de ascenso del mejillón dorado.

En los tratamientos con molusquicidas el número de individuos disminuyó debido al incremento de la mortalidad al aumentar el tiempo de contacto, por lo tanto se evaluó el valor promedio de H durante los 7 primeros días del experimento (H7), periodo en el cual no se observó mortalidad bajo ningún tratamiento. Los resultados se presentan en la Figura 3.15. Ninguno de los tratamientos con molusquicida, superó el 8 % de H promedio en 7 días. Existen diferencias estadísticamente significativas entre el control y los tratamientos con Sanurfloc Bioxi B (3,75 mg/l de activo B) ($p < 0,05$); entre el control y las combinaciones entre Sanurfloc Bioxi B y cloro (3,75 mg/l de activo B+ 3,75 mg/l de cloro; 7,5 mg/l de activo B + 2,5 mg/l de cloro) ($p < 0,05$); entre el control y cloro en dosis de 2,5 mg/l ($p < 0,05$). Debe destacarse que los valores alcanzados de H7 % son globalmente bajos y menores al 8 % para todos los tratamientos y el control.

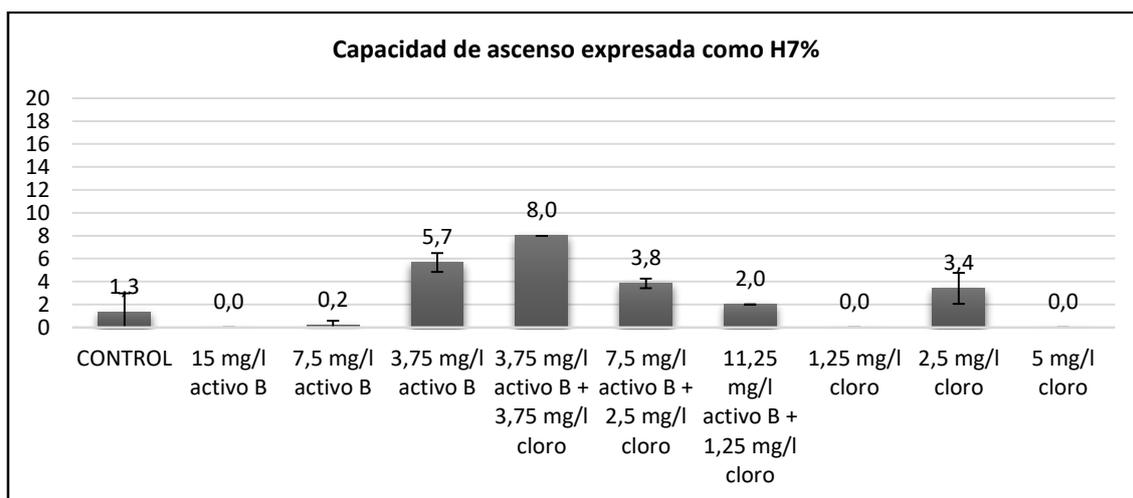


Figura 3.15. Capacidad de ascenso de *L. fortunei*, expresada como H7 (%), bajo los distintos tratamientos de activo B, cloro y sus combinaciones. Las barras de error representan la desviación estándar.

Por otra parte, se ha observado que los moluscos normalmente se adhieren en dos sitios predominantes, el vértice de unión entre la pared y el fondo del acuario (0 cm) o bien justo por debajo del nivel del agua en la interfaz aire-agua (10 cm). Se analizó la distribución de los mejillones a las diferentes alturas en cada tratamiento. Se ha observado que una vez que el mejillón dorado se ha adherido en un sitio a una determinada la altura, normalmente esta altura se mantiene constante en el tiempo. Se observó que cuando los moluscos son depositados en el acuario, entre un 80-100 % se encuentran adheridos dentro de las 24 horas. Dado que la relocalización parece ser poco frecuente, se evaluó la variación de la altura de los mejillones bajo cada tratamiento luego de 24 horas.

En la Tabla 3.7, se presentan los resultados de la distribución del número n de los mejillones dorados por altura alcanzada (0, 5 y 10 cm), bajo los diferentes tratamientos aplicados luego de 24 horas de contacto, bajo 8 horas de iluminación y 16 horas de oscuridad desde la dosificación. Se presenta el porcentaje de individuos presentes en el fondo del acuario y el porcentaje de individuos adheridos.

Se observa que el porcentaje de individuos presentes en fondo del acuario es alto, y varía entre 92 y 100 % en los diferentes tratamientos aplicados. Mientras que la cantidad de individuos que ascienden por encima de los 5 cm no superan en ningún caso el 8 %. No se observó una relación con el aumento de la dosis de molusquicida. Por lo tanto, podemos sugerir que los moluscos no se relocalizan incluso bajo condiciones hostiles para el desarrollo de la vida. Sin embargo, el estudio de la quimiotaxis bajo este diseño experimental es difícil, dado que el acuario es dosificado con el molusquicida que inmediatamente se disuelve y genera una solución homogénea sobre toda la columna de agua. Un diseño experimental más conveniente, debe tener un gradiente de concentración sobre el cual pueda evaluarse una direccionalidad del movimiento del mejillón dorado.

En la Figura 3.16, se presentan los resultados de las distribuciones entre los individuos adheridos en el fondo del acuario, los individuos libres en el fondo del acuario y los individuos adheridos en altura en las paredes de del acuario. En la figura 3.17, se observa que la proporción de individuos libres en el fondo fue mayor bajo el tratamiento de 5 mg/l de cloro en relación al control ($p < 0,05$) mientras que no se observan diferencias significativas entre el control y los demás tratamientos ($p > 0,05$).

N° Trat.	Tratamiento	Número de individuos por altura luego de 24 horas			Porcentaje de ind. en el fondo del acuario	Porcentaje de ind. adheridos al acuario
		10 cm	5 cm	0 cm		
C-30	Control (n=150)	24	5	121	81 %	100 %
C-0	Control (n=50)	0	0	50	100 %	88 %
1 (*)	15 mg/l activo B	0	0	50	100 %	80 %
2 (*)	7,5 mg/l activo B	0	0	50	100 %	68 %
3 (*)	3,75 mg/l activo B	3-4	0-2	46-47	92-94 %	76 %
4	3,75 mg/l activo B y 3,75 mg/l cloro	4	0	46	92 %	70 %
5	7,5 mg/l activo B y 2,5 mg/l cloro	1	2	47	94%	88 %
6	11,25 mg/l activo B y 1,25 mg/l cloro	1	0	49	98 %	82 %
7	1,25 mg/l cloro	0	0	50	100 %	88 %
8 (*)	2,5 mg/l cloro	0-2	0-2	46-50	92-100 %	72 %
9 (*)	5 mg/l cloro	0	0	50	100 %	50 %

Tabla 3.7. Distribución del número de *L. fortunei* (n=50) por altura alcanzada (0, 5 y 10 cm), bajo los diferentes tratamientos aplicados luego de 24 horas de contacto, bajo 8 horas de iluminación y 16 horas de oscuridad desde la dosificación. C-30 corresponde al primer ensayo control de 30 días de duración (15 réplicas, n=150 individuos) y C0 corresponde al segundo ensayo control de 60 días de duración (5 réplicas, n=50 individuos). (*) Datos obtenidos en dos ensayos diferentes.

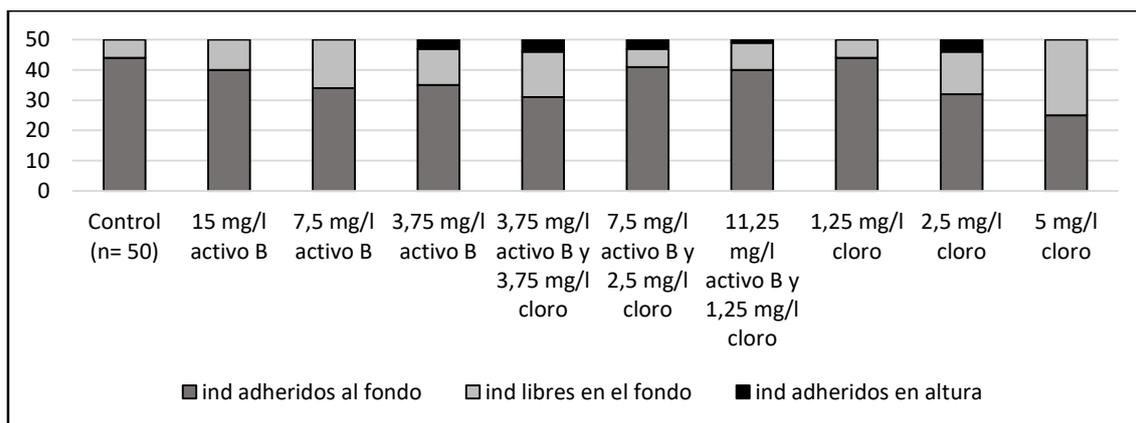


Figura 3.16. Distribución de *L. fortunei* (n=50) en tres grupos: 1- individuos adheridos en el fondo del acuario, 2- individuos libres en el fondo del acuario y 3- individuos adheridos en altura en las paredes del acuario, luego de 24 hs de tratamiento.

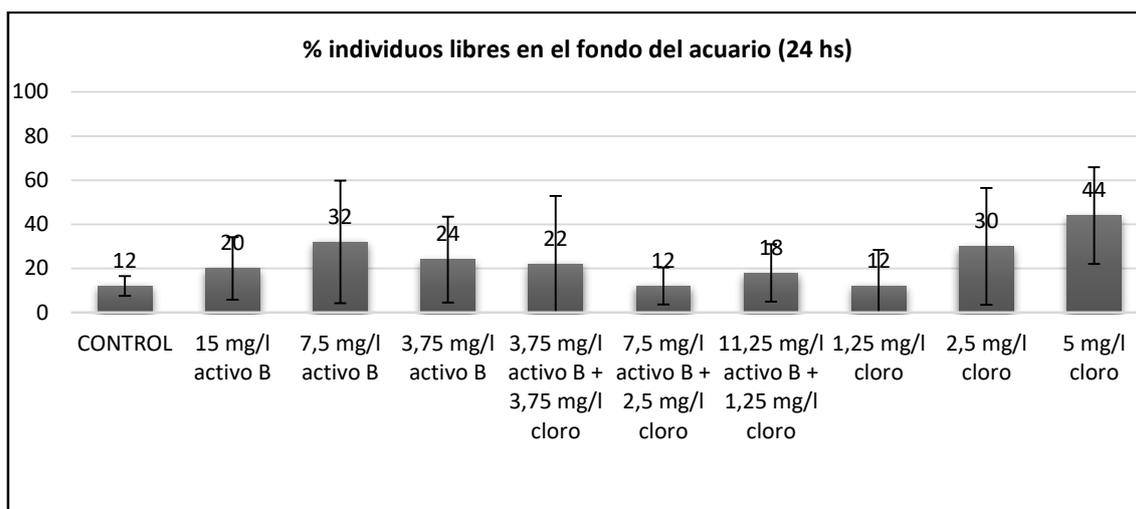


Figura 3.17. Porcentaje de individuos libres de *L. fortunei* en el fondo del acuario bajo cada tratamiento, luego de 24 hs de contacto, las barras de error representan la desviación estándar. Diferencia significativa entre el control y 5 mg/l de cloro ($p = 0,0396$).

3.5. EFECTOS DE SANURFLOC BIOXI B, CLORO Y SUS COMBINACIONES SOBRE LA CAPACIDAD DE ADHESIÓN AL SUSTRATO DEL MEJILLON DORADO

La remoción del mejillón dorado por afectación de la adhesión del biso puede ser una estrategia efectiva para el control de la bioincrustación (Li y col., 2019). Se evaluó el efecto de los tratamientos con Sanurfloc Bioxi B, cloro y sus combinaciones sobre la capacidad de adhesión del mejillón dorado (Figura 3.18). En los tratamientos con molusquicidas el número de individuos disminuyó debido al incremento de la mortalidad, al aumentar el tiempo de contacto. Por lo tanto, se evaluó el valor promedio de A durante los 7 primeros días del experimento (A7), periodo en el cual no se observó mortalidad bajo ninguna condición.

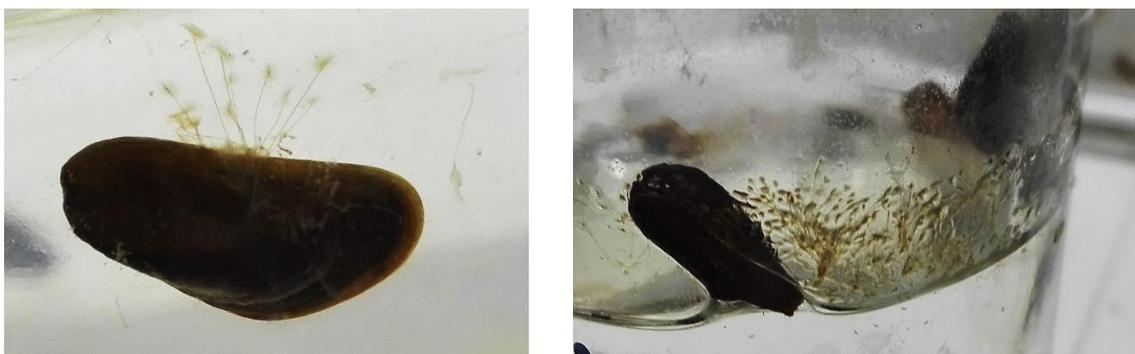


Figura 3.18. Hilo bisal de de *L. fortunei*, se observan los hilos bisales y las placas unidas al vidrio. Fotografía: Lic. Virginia Martinez

En la Figura 3.19; se presentan los resultados del porcentaje de adhesión promedio (A%) frente al tiempo, bajo los tratamientos con cloro. Se observa que las dosis de 2,5 y 5 mg/l de cloro presentan menor adhesión del mejillón dorado al vidrio respecto al control ($p < 0,05$). En la Figura 3.20; se presentan los resultados para el porcentaje de adhesión promedio A% frente al tiempo, bajo los tratamientos de Sanurfloc Bioxi B (expresado como activo B), se observa que las dosis de 7,5 y 15 mg/l de activo B presentan menor adhesión del mejillón dorado al vidrio respecto al control ($p < 0,05$).

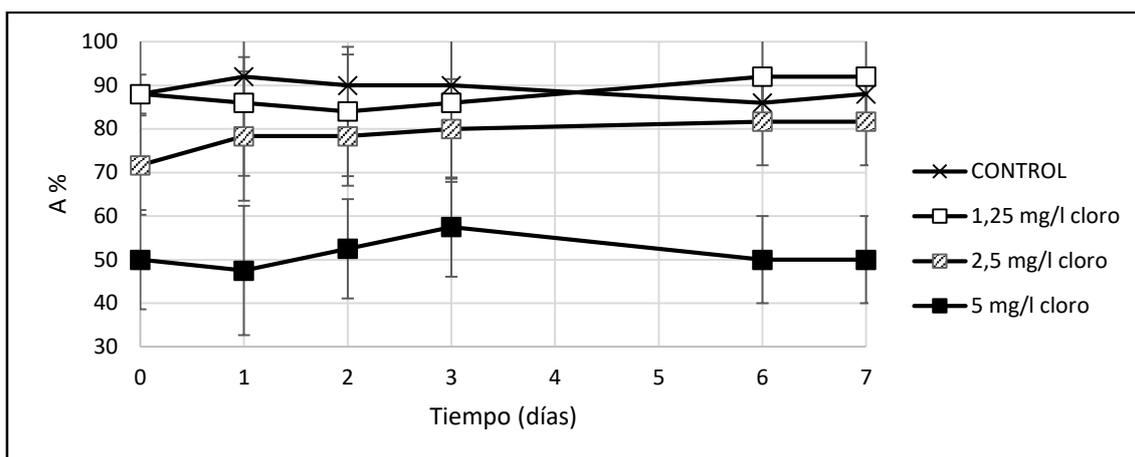


Figura 3.19. Porcentaje de adhesión promedio A de *L. fortunei* frente al tiempo, bajo los tratamientos de cloro en los 7 primeros días de ensayo, las barras de error representan la desviación estandar.

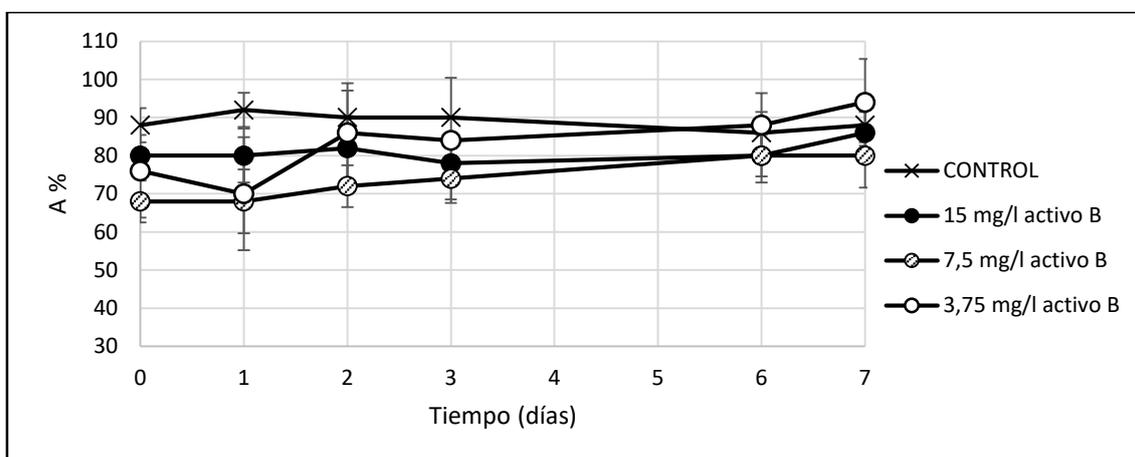


Figura 3.20. Porcentaje de adhesión promedio A de *L. fortunei* frente al tiempo, bajo los tratamientos de activo B en los 7 primeros días de ensayo, las barras de error representan la desviación estandar.

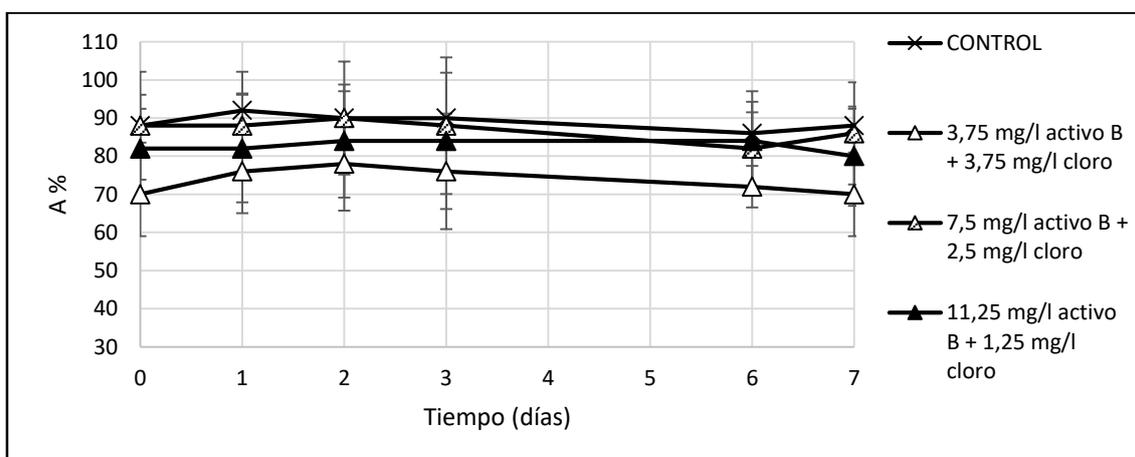


Figura 3.21. Porcentaje de adhesión promedio A de *L. fortunei* frente al tiempo, bajo los tratamientos combinados de activo B y cloro, en los 7 primeros días de ensayo, las barras de error representan la desviación estandar.

En la Figura 3.21; se presentan los resultados para el porcentaje de adhesión promedio A frente al tiempo, bajo los tratamientos combinados de Sanurfloc Bioxi B (expresado como activo B) con cloro, se observa que las dosis combinada de 3,75 de activo B + 3,75 mg/l de cloro presenta menor adhesión del mejillón dorado al vidrio respecto al control ($p < 0,05$).

Por otra parte, se evaluó A7 como el **valor promedio de A en los primero 7 días** de experimento y se expresó como porcentaje. En este caso el valor de A7 varía entre cero y 100 %, cuando A7 es igual a cero significa que ningún mejillón se encontró adherido durante los 7 días de experimento, mientras que si el valor de A7 es 100 % significa que todos los mejillones se encontraban adheridos en los 7 días de experimento.

Los resultados de A7 se presentan en la Figura 3.22. Durante el periodo evaluado se observó que el 89 % de los individuos se encontraban adheridos en el control. Los porcentajes de reducción de A7 respecto al control, bajo los diferentes tratamientos se resumen en la Tabla 3.8.

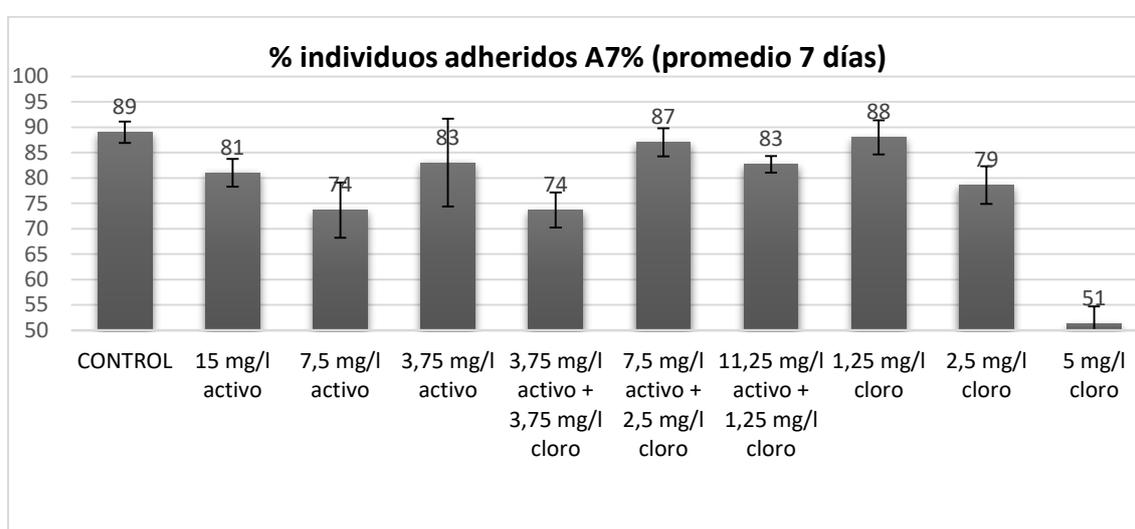


Figura 3.22. Adhesión de *L. fortunei* expresado como A7 (%). (Porcentaje de individuos adheridos promedio entre 5 réplicas y 7 días de experimento, las barras de error representan la desviación estandar).

El tratamiento con 1,25 mg/l de cloro, no mostró efectos negativos sobre la adhesión. A dosis mayores, los tratamientos con cloro mostraron una disminución de la adhesión respecto al control sin tratamiento, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) bajo los tratamientos 2,5 y 5 mg/l de cloro, reduciendo los valores de adhesión en un 11 y 42 % respectivamente.

El tratamiento con 3,75 mg/l de activo B, no mostró efectos negativos sobre la adhesión. A dosis mayores, los tratamientos con Sanurfloc Bioxi B mostraron una disminución de la adhesión respecto al control sin tratamiento, encontrándose una diferencia significativa ($p < 0,05$) bajo los tratamientos de 7,5 y 15 mg/l de activo B, reduciendo los valores de adhesión entre un 8-16 %.

El tratamiento 3,75 mg/l de activo B y 3,75 mg/l de cloro, mostró una disminución de la adhesión respecto al control sin tratamiento, encontrándose una diferencia significativa entre ambos ($p < 0,05$), reduciendo los valores de adhesión en un 16 % bajo el tratamiento. Las demás combinaciones de tratamientos (7,5 mg/l de activo B y 2,5 mg/l de cloro; y 11,25 mg/l de activo B y 1,25 mg/l de cloro) no mostraron diferencias significativas con los valores de adhesión encontrados en el control ($p > 0,05$).

N° Trat.	Tratamiento	Reducción del porcentaje de adhesión respecto al control	Reducción del porcentaje de adhesión respecto al control (min-max)
1	15 mg/l activo B	9 ± 4 % (*)	2 - 13 %
2	7,5 mg/l activo B	17 ± 8 % (*)	7 - 26 %
3	3,75 mg/l activo B	7 ± 11 %	0 - 24 %
4	3,75 mg/l activo B y 3,75 mg/l cloro	17 ± 3 % (*)	13 - 20 %
5	7,5 mg/l activo B y 2,5 mg/l cloro	2 ± 2 %	0 - 5 %
6	11,25 mg/l activo B y 1,25 mg/l cloro	7 ± 3 %	2 - 11 %
7	1,25 mg/l cloro	1 ± 6 %	0 - 7 %
8	2,5 mg/l cloro	12 ± 5 % (*)	5- 19 %
9	5 mg/l cloro	42 ± 4 % (*)	36- 48 %

Tabla 3.8. Reducción de A7 en relación al control. (*) = Se observan efectos significativos ($p < 0,05$).

La dosis más efectiva que inhibe la adhesión del mejillón dorado al vidrio, fue de 5 mg/l de cloro. Los tratamientos con Sanurfloc Bioxi B muestran un efecto en la reducción de la adhesión entre un 9-17 % a las dosis de 7,5 y 15 mg/l de activo B, en este mismo rango de acción se encuentra la reducción de la adhesión del 12 % con la dosis de 2,5 mg/l de cloro y de 17 % con la combinación de 3,75 mg/l activo B y 3,75 mg/l de cloro. Las demás combinaciones de Sanurfloc Bioxi B y cloro, así como la dosis de 3,75 mg/l de activo B no mostraron efectos significativos sobre la reducción de la adhesión ($p > 0,05$).

En el estudio realizado por Li (2019), se evaluó el efecto de cuatro oxidantes químicos (hipoclorito de sodio, permanganato de potasio, peróxido de hidrogeno y cloramina T) sobre la adhesión a través del biso del mejillón dorado, se utilizaron individuos de longitud valvar de $2 \pm 0,3$ cm. Sus experimentos incluyeron: 1- la evaluación de producción de bisos, determinando el número y longitud de los mismos; 2- la evaluación de la pérdida de los hilos bisales; 3- la resistencia, que fue evaluada determinando la fuerza necesaria para romper el hilo bisal; 4- la extensibilidad, que se determinó evaluado el sitio de ruptura o quiebre luego de aplicar una fuerza y 5- la disolución de los bisos en presencia de los oxidantes. El hipoclorito de sodio en dosis de 0,5 mg/l de cloro aplicado sobre agua corriente de cloro a una temperatura de trabajo de 19 ± 1 °C, luego de 7 días, mostró un 8.6 % de mortalidad, un 69 % de reducción de número de hilos bisales, un 58 % de reducción de la longitud de los hilos bisales, 75,9 % de incremento en la pérdida de hilo bisal, un 70 % de disminución de la fuerza de ruptura y alcanza un 21 % de disolución en relación al control.

Mientras que en el trabajo de Li, se utilizó agua de cloro, en nuestro experimento se trabajó utilizando agua de río con una demanda de cloro de 4 mg/l. En ambos trabajos se utilizó una temperatura similar, 19 y 20 °C. Los mejillones dorados utilizados por la autora tuvieron una longitud valvar de 20 mm, mientras que en nuestro experimento se utilizó una talla menor (6-15 mm de longitud valvar). Según los resultados de la autora se encuentra un 70 % de reducción de aquellos parámetros relevantes para la adhesión a la dosis de 0,5 mg/l de cloro. En nuestro estudio se observó más de un 40 % de reducción de la adhesión, a la dosis de 5 mg/l de cloro. Si consideramos demanda de cloro del agua de río de 4 mg/l obtenemos que el cloro residual de 1 mg/l ejerce ese efecto de reducción sobre la adhesión.

Es interesante observar que la diferencia encontrada en el porcentaje de adhesión promedio A, tiene lugar desde el día cero del experimento (Figura 3.19). Se ha observado que normalmente una vez adherido al sustrato en una determinada altura, ésta no se modifica por otra altura por relocalización y la altura inicial permanece constante en el tiempo.

Es de destacar, que no se ha observado ningún mejillón filtrando el medio acuoso sin estar adherido al sustrato. A continuación se evaluara el efecto del producto Sanurfloc Bioxi B, cloro y sus combinaciones sobre la filtración del mejillón dorado.

3.6. EFECTO DE SANURFLOC BIOXI B, CLORO Y SUS COMBINACIONES SOBRE LA FILTRACIÓN DEL MEJILLON DORADO

3.6.1. Análisis de los efectos de Sanurfloc Bioxi B y cloro y sus combinaciones sobre la filtración mediante inspección visual de la exposición de los sifones al medio

La filtración es una forma de alimentación sobre la base de las partículas que están en suspensión en la columna de agua. Dado que normalmente las partículas con valor alimentario se encuentran en baja concentración, los organismos filtradores están obligados a procesar grandes volúmenes de agua para obtener suficiente alimento (Jørgensen, 1990). En este trabajo se evaluó la capacidad de filtración del mejillón dorado. Se consideró que el mejillón se encontraba filtrando cuando presentaba sus valvas entreabiertas, exponiendo sus sifones (Figura 3.23), a la vez que se observaba ingreso y salida de material a través de los sifones inhalantes y exhalantes. En este estudio, se evaluó mediante inspección visual, el efecto inhibitorio de los productos Sanurfloc Bioxi B, cloro y sus combinaciones, sobre la capacidad de filtración de los moluscos.



Figura 3.23. Sifones del mejillón dorado. En la izquierda se presenta el mejillón dorado exponiendo los sifones en un tubo de ensayo, a la derecha se observa los sifones del mejillón dorado *in vivo* visto en microscopio invertido con un aumento 40X. Fotografías: Virginia Martinez.

En los tratamientos molusquicidas el número de individuos disminuyó debido al incremento de la mortalidad, al aumentar el tiempo de contacto. Por lo tanto, se evaluó el valor promedio de F durante los 7 primeros días del experimento (F7), periodo en el cual no se observó mortalidad bajo ninguna condición.

Los resultados se presentan en la Figura 3.24. Durante el periodo evaluado de 7 días, se observó que el 64 % de los individuos se encontraban filtrando en el control, mientras que la filtración bajo todos los tratamientos con molusquicidas, fue menor, entre 0 y 14,33 %. El análisis de datos

arrojo como resultados que las diferentes dosis de Sanurfloc Bioxi B, cloro y sus mezclas no son significativamente diferentes entre ellas ($p > 0,05$).

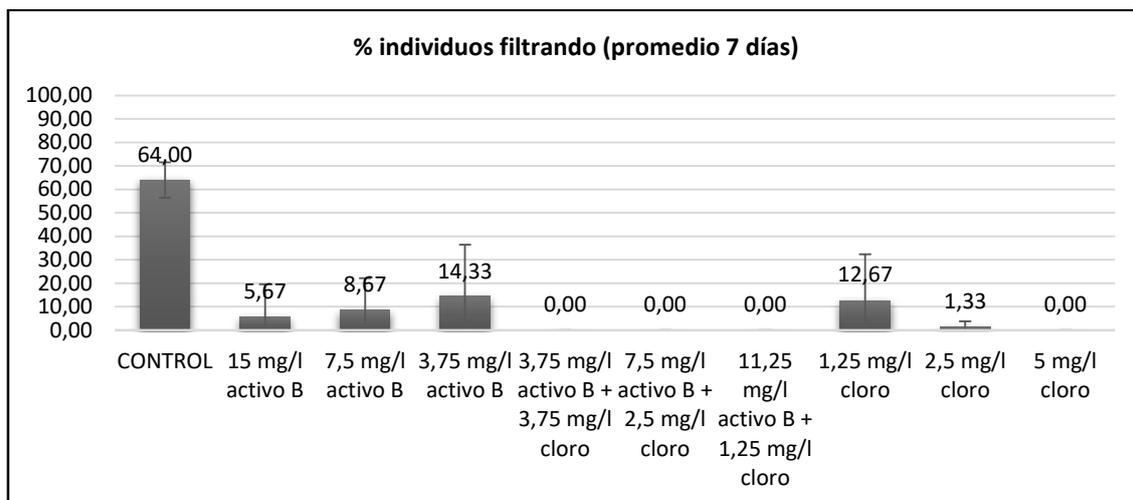


Figura 3.24. Filtración expresado como F (%). (Porcentaje de individuos de mejillón dorado filtrando, promedio entre 5 réplicas y 7 días de experimento, las barras de error representan la desviación estándar).

El **porcentaje de reducción de la filtración** respecto al control R7 (promedio de R durante los primeros 7 días), el porcentaje de reducción de la filtración mínimo y máximo en el periodo de 0 a 7 días, para cada tratamiento se presentan en la Tabla 3.9.

N° Trat.	Tratamiento	Porcentaje de reducción de la filtración respecto al control, promedio entre 7 días. R7	Porcentaje de reducción de la filtración respecto al control (mín.-máx.)
1	15 mg/l activo B	90 ± 25 %	39 -100 %
2	7,5 mg/l activo B	85 ± 24 %	54 -100 %
3	3,75 mg/l activo B	75 ± 38 %	14 -100 %
4	3,75 mg/l activo B y 3,75 mg/l cloro	100 ± 0,0 %	100 %
5	7,5 mg/l activo B y 2,5 mg/l cloro	100 ± 0,0 %	100 %
6	11,25 mg/l activo B y 1,25 mg/l cloro	100 ± 0,0 %	100 %
7	1,25 mg/l cloro	80 ± 32 %	39 -100 %
8	2,5 mg/l cloro	98 ± 4 %	39 -100 %
9	5 mg/l cloro	100 ± 0,0 %	100 %

Tabla 3.9. Reducción de F7 en relación al control y valores máximos y mínimos durante el periodo de 0-7 días de tratamiento.

Los tratamientos más efectivos que obtuvieron una reducción de la filtración respecto al control, R7 % (promedio entre 7 días), de $100 \pm 0,0$ %, fueron los tratamientos de 5 mg/l de cloro y las combinaciones de Sanurfloc Bioxi B y cloro (tratamientos 4, 5 y 6). En segundo lugar, la dosis de 2,5 mg/l de cloro obtuvo un valor de reducción R7% de 98 ± 4 %, siendo el segundo tratamiento más efectivo. En tercer lugar, los tratamientos con 3,75; 7,5 y 15 mg/l de activo B, produjeron una reducción en la filtración de 75, 85 y 90 % respectivamente, sin embargo estos resultados presentaron gran dispersión y la desviación estándar varió entre 24 y 38 %. Finalmente, el tratamiento con 1,25 mg/l cloro, produjo una reducción en la filtración de 80 ± 32 %.

En la Figura 3.25 se presenta los porcentajes de reducción de la filtración respecto al control, en función de las dosis empleadas de ambos productos. Se observa que el cloro alcanza el 100 % de reducción a dosis menores que las del producto Sanurfloc Bioxi B (activo B). Mientras que el 50 % de reducción de la filtración se alcanza con 0,75 mg/l de cloro y 2,25 mg/l de activo B.

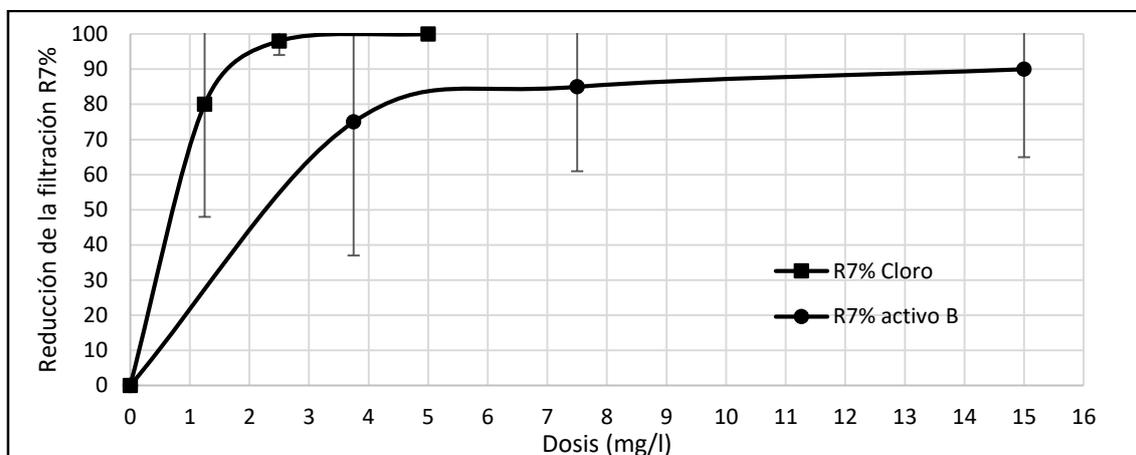


Figura 3.25. Reducción de la filtración expresado como R7 (%) bajo las diferentes dosis de Sanurfloc Bioxi B (activo B) y cloro (, las barras de error representan la desviación estándar).

La inspección visual nos permitió observar la apertura de las valvas, la exposición de los sifones inhalantes y exhalantes al medio acuoso y el flujo del agua debido a la filtración. Sin embargo, no puede evaluarse por este método si la dosificación de productos molusquicidas afecta la velocidad de filtración. Para determinar los efectos sobre la tasa de filtración se utiliza un método que consiste en evaluar de la concentración de un colorante vital, el rojo neutro, presente en el medio acuoso y que es filtrado por el mejillón dorado. De esta manera es posible determinar la disminución de la concentración del colorante durante un determinado periodo de tiempo.

3.6.2. Análisis de los efectos de Sanurfloc Bioxi B, cloro y sus combinaciones sobre la tasa de filtración de colorante rojo neutro

En este trabajo se utilizó el rojo neutro como colorante vital, este reactivo es de fácil disolución y alcanza instantáneamente una solución homogénea que se mantiene a una concentración constante durante un periodo mayor a 96 horas. La concentración del colorante en la solución puede ser fácilmente determinada a través de espectrofotometría y ser evaluada a los diferentes tiempos de muestreo.

El colorante es removido de la solución luego de ser filtrado por el molusco, e incorporado a las heces del animal que al ser excretadas sedimentan y no se diluyen en la solución de estudio (Figura 3.26).

El producto Sanurfloc Bioxi B no afecta al colorante, la solución de rojo neutro mantiene su concentración y color luego de la aplicación de producto. Sin embargo, se encontró que el cloro puede afectar el color de la solución del colorante típicamente rojo, tornándolo anaranjado. Esto es debido al incremento de pH en dosis altas de cloro, ya que el rojo neutro presenta un intervalo de viraje a un valor de pH entre 6,8–8,4. Debido a esto se trabajó a pH menores a 8 y para todos los tratamientos se realizó paralelamente una solución de colorante y producto sin moluscos, como control de absorbancia a los diferentes tiempos.

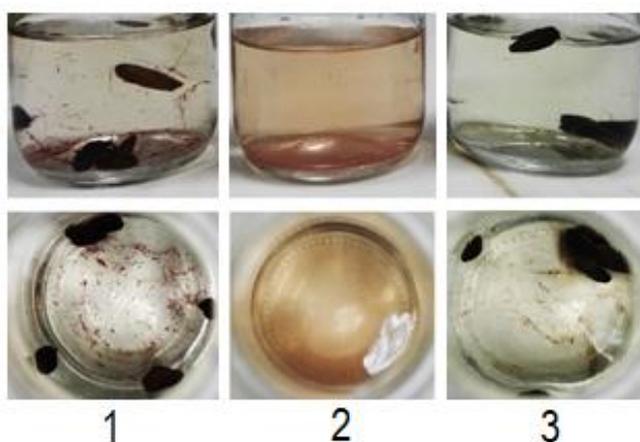
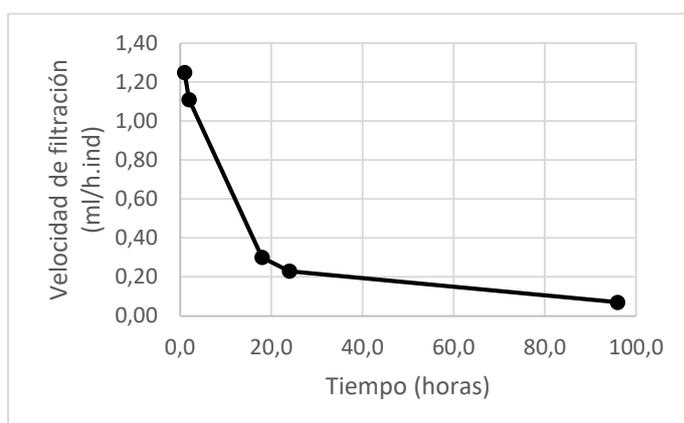


Figura 3.26. (1) Mejillones sumergidos en agua de río con 3 mg/l colorante vital rojo neutro, el color del agua es transparente y presenta pseudofeces rojizas en el fondo. (2) agua de río con 3 mg/l colorante vital rojo neutro, se observa el color del rojo neutro (3) Mejillones sumergidos en agua de río el color del agua es transparente y presenta pseudofeces en el fondo. Luego de 24 horas de aplicación.

Se observó una caída de la tasa de filtración a lo largo del tiempo para el control (Figura 3.27). Los valores obtenidos fueron de 1,25 ml/h. por individuo luego de 1 h de incorporado el colorante rojo neutro, y de 0,3 ml/h. por individuo luego de 18 hs de incorporado el colorante rojo neutro.



TIEMPO (h)	Velocidad de filtración (ml/h. ind.)
1,0	1,25
2,0	1,11
18,0	0,30
24,0	0,23
96,0	0,07

Figura 3.27. Evolución en el tiempo de la velocidad de filtración de *L. fortunei* (expresada como ml filtrados durante 1 hora por un individuo (ml/h. ind). El medio acuoso fue una solución de agua de río con 3 mg/l de rojo neutro.

Existen diferentes métodos para determinar la tasa de filtración de los moluscos. Una de las técnicas de laboratorio consiste en el uso de partículas en suspensión (algas). Esta técnica se realiza incorporando un cultivo de células algales al medio acuoso donde se ubica un individuo de mejillón dorado, luego se realiza un recuento en cámara de sedimentación en el microscopio invertido al comienzo y al final del tiempo de evaluación. Se determina la velocidad de filtración calculando el cociente entre la diferencia de concentración de las algas y la diferencia del tiempo entre los dos muestreos. Sin embargo, esta técnica presenta varias dificultades para su ejecución, primero es difícil mantener una solución homogénea de las células que tienden a sedimentar o a flotar. Para lograr una suspensión homogénea debe agitarse constantemente la solución, lo cual puede perturbar a los moluscos que reaccionan cerrando las valvas e

interrumpiendo la filtración. Por otra parte, puede incrementarse el recuento de células algales debido a la reproducción, si se utilizan tiempos de evaluación muy extensos.

En nuestro estudio, la incorporación de productos oxidantes sobre células algales, puede incrementar la demanda de oxidante. Además, el cultivo puede ser susceptible a la oxidación, los productos pueden destruir las células, obteniendo un recuento menor que conlleva a una estimación errónea de una tasa de filtración más alta. Por todos estos motivos, se utilizó la técnica que consiste en el uso de un colorante vital, que al ser filtrado por el mejillón es eliminado de la solución, disminuyendo su concentración.

Los estudios realizados por Sylvester (2006), con cultivo de células algales a tiempos cortos, muestran que el mejillón dorado puede filtrar entre 125 y 350 ml de agua por hora con valores extremos de 45 a 514 ml/h. En esos estudios, se evaluó la tasa de filtración, computando los tiempos de filtración desde el momento de la exposición de los sifones, y descontando los momentos que el mejillón cerraba las valvas. En nuestro trabajo no se consideró esta diferencia para determinar el tiempo, lo cual puede conllevar a valores calculados más bajos en las tasas de filtración en nuestros resultados.

Por otra parte, mientras que en nuestro experimento la talla de los moluscos fue de 6 a 15 mm, los moluscos utilizados en el trabajo de Sylvester (2006) tenían una talla de 15 mm de longitud valvar. Debido a que la tasa de filtración del mejillón dorado, aumenta con el incremento de la talla del organismo, es de esperar encontrar valores más bajos en las tasas de filtración.

Otros autores (Zihon-Lukanina y col., 1990; Riisgård, 2001) que trabajaron previamente en la filtración por bivalvos han notado que el uso de volúmenes pequeños o tiempos de filtración largos pueden dar lugar a subestimación de la tasas debido a refiltrado del agua. En el trabajo de Sylvester (2006) y en nuestro trabajo el volumen utilizado fue de 0,4 y 0,5 litros respectivamente. El tiempo de evaluación en el trabajo del autor fue de 30 minutos y en nuestro trabajo fue 1 hora. Sin embargo, para el cálculo de la tasa de filtración en el trabajo del autor, se descontó del tiempo ensayado los periodos en que las valvas estuvieron cerradas. Por otra parte, la tasa de filtración de *L. fortunei* se han estimado en varios estudios, pero el rango de los valores informados es muy grande: 0,2 a 725 ml/h.ind. (Pestana y col., 2009; Gazulha 2010 y 2012; Gazulha y col. 2012a y 2012b), o 0.1 a 29.5 ml/mg de tejido seco (Sylvester y col., 2005; Cataldo y col., 2012b).

Para la determinación del efecto inhibitorio de los productos oxidantes sobre la velocidad de filtración del mejillón dorado, se determinó la velocidad de filtración bajo los diferentes tratamientos con Sanurfloc Bioxil B, cloro y sus combinaciones. Debido a dificultades experimentales, los tiempos a los que se realizó la evaluación de la velocidad de filtración para los tratamientos fueron de 20, 24 y 48 hs desde la incorporación de los productos molusquicidas y del colorante. Se observó que la velocidad de filtración fue < 0,06 ml/h.ind. bajo todos los tratamientos con molusquicidas. Mientras que para el control sin molusquicida la velocidad de filtración tomo un valor de 0,4 ml/h.ind. luego de 20 horas (Figura 3.28).

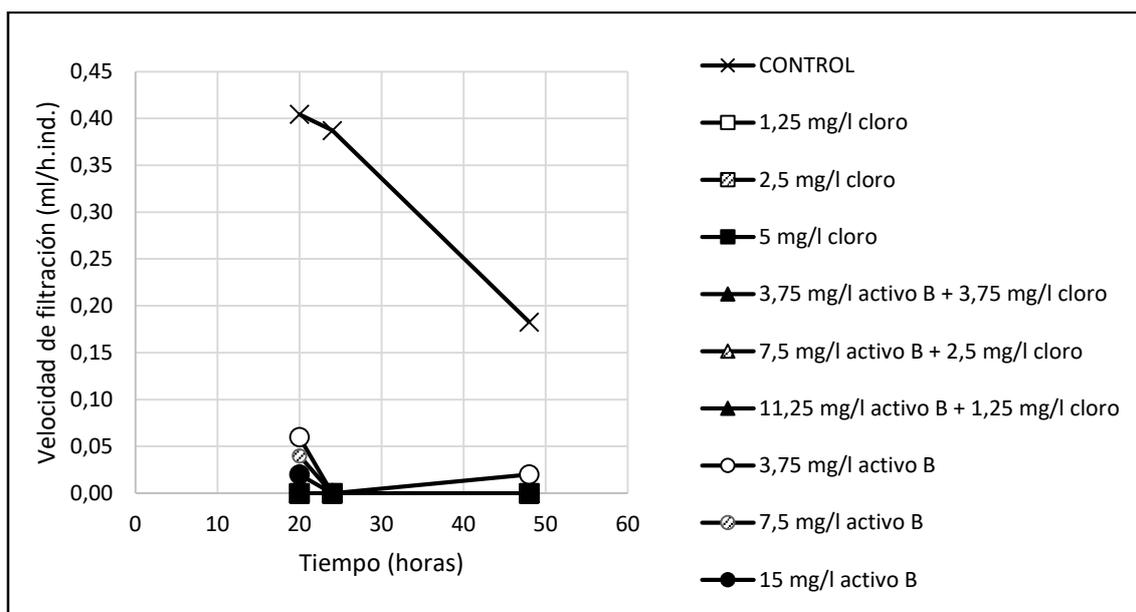


Figura 3.28. Velocidad de filtración de *L. fortunei* bajo los diferentes tratamientos con cloro, activo B y sus combinaciones.

3.7. COMPARACIÓN DE EFECTOS DE SANURFLOC BIOXI B, CLORO Y SUS COMBINACIONES SOBRE LA MORTALIDAD, MOVILIDAD, ADHESION Y FILTRACION DEL MEJILLON DORADO

En la Tabla 3.10, se resumen los resultados obtenidos a lo largo del trabajo, para los distintos tratamientos y su efecto sobre la mortalidad, la movilidad, la adhesión y la filtración.

TRATAMIENTO	MORTALIDAD	MOVILIDAD	ADHESIÓN	FILTRACIÓN
	Tiempo para alcanzar el 50 % de mortalidad (días)	Porcentaje de ind. en el fondo del acuario	Reducción de la adhesión	Reducción de la filtración
15 mg/l activo B	33	100 %	9 ± 4 % (*)	90 ± 25 %
7,5 mg/l activo B	43	100 %	17 ± 8 % (*)	85 ± 24 %
3,75 mg/l activo B	> 60	92-94 %	7 ± 11 %	75 ± 38 %
3,75 mg/l activo B y 3,75 mg/l cloro	21	92 %	17 ± 3 % (*)	100 ± 0,0 %
7,5 mg/l activo B y 2,5 mg/l cloro	29	94 %	2 ± 2 %	100 ± 0,0 %
11,25 mg/l activo B y 1,25 mg/l cloro	34	98 %	7 ± 3 %	100 ± 0,0 %
1,25 mg/l cloro	> 60	100 %	1 ± 6 %	80 ± 32 %
2,5 mg/l cloro	29	92-100%	12 ± 5 % (*)	98 ± 4 %
5 mg/l cloro	17	100 %	42 ± 4 % (*)	100 ± 0,0 %

Tabla 3.10. Resumen de resultados obtenidos. Verde= opción mas favorable, Azul= se observa efecto, Negro= no se observa efecto. (*) el efecto es significativo ($p < 0,05$).

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

4.1. SINTESIS: MORTALIDAD DEL MEJILLÓN DORADO BAJO LOS TRATAMIENTOS CON SANURFLOC BIOXI B, CLORO Y SUS COMBINACIONES

En este trabajo se logró poner a punto una técnica para el estudio de la mortalidad del mejillón dorado adulto bajo tratamientos con productos molusquicidas.

La mortalidad del mejillón dorado fue realizada en un medio acuoso complejo como es el agua de Río de la Plata, cuyos parámetros fisicoquímicos y microbiológicos fueron controlados periódicamente. Se utilizó mejillones dorados de 6-15 mm de longitud valvar, a la temperatura de 20° C.

Respecto a la mortalidad producida por el cloro, se encontraron los siguientes valores de DL50 de $5,1 \pm 0,2$; $3,3 \pm 0,1$ y $2,58 \pm 0,09$ mg/l luego de 17, 21 y 27 días de exposición.

A tiempos más prologados los valores de DL50 fueron de $2,09 \pm 0,08$; $1,71 \pm 0,05$ y $1,51 \pm 0,04$ mg/l de cloro luego de 41, 50 y 60 días de exposición.

En relación a la mortalidad bajo los tratamientos con el producto Sanurfloc Bioxi B, los valores de DL50 fueron $345 \pm 0,4$, $139 \pm 0,31$ y $27 \pm 0,2$ mg/l luego de 17, 21 y 30 días de exposición respectivamente.

El valor de DL50 disminuye exponencialmente con el tiempo de contacto, alcanzando valores $8,6 \pm 0,2$; $6,3 \pm 0,1$; $4,7 \pm 0,1$ mg/l de activo de Sanurfloc Bioxi B, a los 41, 50 y 60 días de tiempo de contacto.

En todos los tiempos ensayos, los valores de DL50 obtenidos con la aplicación de cloro fueron menores que los obtenidos aplicando el activo de Sanurfloc Bioxi B.

La dosis óptima del cloro fue de 5 mg/l porque se alcanza una mortalidad mayor al 90 % en 30 días.

La dosis óptima del Sanurfloc Bioxi B fue de 15 mg/l porque se alcanza una mortalidad del 92% a los 60 días.

En relación a las combinaciones secuenciales del producto Sanurfloc Bioxi B y cloro, se analizó el tiempo de contacto necesario para alcanzar el 50% de mortalidad. Se observó que para tiempos cortos de contacto (17 a 29 días), las combinaciones ensayadas ($3,75$ mg/l de cloro + $3,75$ mg/l de Sanurfloc Bioxi B; $2,5$ mg/l de cloro + $7,5$ mg/l de Sanurfloc Bioxi B) el efecto predominante correspondió al cloro, y que la adición del Sanurfloc Bioxi B no contribuyó al en el incremento de la mortalidad producida por el cloro.

La combinación de $11,25$ mg/l activo de Sanurfloc Bioxi B + $1,25$ mg/l cloro, alcanzó el 50 % de mortalidad a los 34 días resultando ser la de elección ya que permite reducir la dosis de cada uno de los molusquicidas en relación a su aplicación en forma individual

Se destaca la capacidad de los mejillones dorados de detectar los productos oxidantes en el agua y cerrar fuertemente su valvas durante un periodo de hasta 3 semanas, lo cual puede modificar sensiblemente los tiempos de contacto con los molusquicidas necesarios para alcanzar el 50 % de la mortalidad.

Por lo tanto, a tiempos largos de contacto o aplicación continua de molusquicidas, es posible combinar los productos reduciendo las dosis de ambos, lo cual permite reducir el costo de la aplicación del molusquicida, reducir la aplicación de cloro, y reducir la aplicación de productos que pueden afectar el medioambiente.

4.2. SÍNTESIS: EFECTOS DE SANURFLOC BIOXI B, CLORO Y SUS COMBINACIONES SOBRE LA MOVILIDAD, LA ADHESIÓN Y LA TASA DE FILTRACIÓN DEL MEJILLÓN DORADO

En relación a la **movilidad** de los mejillones dorados se observó geotaxis positiva. En el tratamiento control los moluscos se disponían en el fondo del acuario entre un 80 – 100% de los individuos ensayados. Este comportamiento, no se modificó en presencia de los molusquicidas Sanurfloc Bioxi B, cloro, y sus combinaciones, luego de 24 horas y 7 días de tiempo de contacto.

En relación a la **adhesión**, se observó que en ausencia de molusquicidas casi un 90% de los mejillones se encontraron adheridos al vidrio del acuario. La aplicación de productos molusquicidas mostró una reducción de la adhesión.

Dosis de cloro de 2,5 y 5,0 mg/l mostraron una reducción de la adhesión del 12 y el 42 %, mientras que dosis de 7,5 y 15 mg/l de activo de Sanurfloc Bioxi B la reducción de la adhesión fue del 9 y el 17 % respectivamente.

La combinación secuencial de 3,75 mg/l de activo de Sanurfloc Bioxi B y 3,75 mg/l de cloro, produjo una reducción de la adhesión del 17%. Mientras que las demás combinaciones de Sanurfloc Bioxi B y cloro, así como la dosis de 3,75 mg/l de activo de Sanurfloc Bioxi B y 1,25 mg/l de cloro, no mostraron efectos significativos sobre la reducción de la adhesión. El cloro fue el producto más eficiente en relación a la reducción de la adhesión.

En relación a la **tasa de filtración** del mejillón dorado, la aplicación cloro en dosis de 1,25; 2,5 y 5 mg/l mostró una reducción de la actividad de filtración del 80, 98 y 100 % respectivamente, mientras que para dosis de 3,75; 7,5 y 15 mg/l de activo de Sanurfloc Bioxi B la reducción de la filtración fue del 75, 85 y 90%. La combinación secuencial en todas las dosis ensayadas de Sanurfloc Bioxi B y cloro, produjeron una reducción de la filtración del 100%. Ambos productos resultan efectivos para la reducción de la filtración.

4.3. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La determinación de la demanda de cloro y de activo Sanurfloc Bioxi B del agua del Rio de la Plata permitió realizar las correcciones requeridas en la dosificación. En todos los casos la demanda de cloro fue mayor que la correspondiente al activo Sanurfloc Bioxi B.

La dosis de 5 mg/l cloro resultó ser la más efectiva debido a que produce la mayor mortalidad, mayor reducción de la adhesión y mayor reducción de la filtración del mejillón dorado en relación a las dosis más bajas ensayadas de cloro, las dosis de Sanurfloc Bioxi B y sus combinaciones.

Si bien el cloro resultó ser un molusquicida más eficiente, utilizando un menor tiempo de contacto y una menor dosis, la abrupta mortalidad de grandes cantidades de moluscos podría generar una gran cantidad de contaminación sobre el agua, disminuyendo su calidad. Es

importante destacar que el cloro genera trihalometanos y halogenuros orgánicos cancerígenos cuando es aplicado sobre agua. Por su parte, el producto Sanurfloc Bioxi B no genera ese tipo de compuestos. Por lo tanto, el producto Sanurfloc Bioxi B es una opción válida para tiempos largos de contacto o aplicación continua.

La dosis de 15 mg/l de activo de Sanurfloc Bioxi B tiene efecto sobre la mortalidad del mejillón dorado adulto en tiempos de contacto largos, también reduce la adhesión del mejillón dorado al vidrio y presenta una gran reducción de la actividad de filtración.

Sanurfloc Bioxi B podría eventualmente considerarse como una estrategia para el control de la problemática de incrustaciones debidas al mejillón dorado, en sistemas confinados como agua de lastre, agua de sistemas de enfriamiento, planta de tratamientos de efluentes, etc.

BIBLIOGRAFÍA

Agudo-Padrón AI, Porto Filho É, Saalfeld K (2012). First confirmed record of *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) in Santa Catarina State, Southern Brazil. En: XI International Congress on Medical and Applied Malacology, Rio de Janeiro (Brasil).

Anderson AC, Reimers RS y deKernion P (1982). A brief review of the current status of alternatives to chlorine disinfection of water. American Journal of Public Health, 72, (11): 1290-1294.

Andrade GR, de Araújo JOLF, Nakamura Filho A, Guañabens ACP, Carvalho, MDD, y Cardoso ANVO (2015). Functional Surface of the golden mussel's foot: morphology, structures and the role of cilia on underwater adhesion. Mater. Sci. Eng. 54: 32–42.

Avelar WE, Martim SL, Vianna MP (2004). A new occurrence of *Limnoperna fortunei* (Dunker 1856) (Bivalvia, Mytilidae) in the State of São Paulo, Brazil. Braz J Biol 64:739–742.

Barbosa FG, Melo AS (2009). Modelo preditivo de sobrevivência do Mexilhão Dourado (*Limnoperna fortunei*) em relação a variações de salinidade na Laguna dos Patos, RS, Brasil. Biota Neotropica 9:407–412.

Belaich M, Oliver C, Pilloff M, Porta A (2006). Evaluation of a biomarker of Cd(II) exposure on *Limnoperna fortunei*. Environ Pollut 144:280–288.

Bilos C, Colombo JC, Rodriguez Presa MJ (1998). Trace metals in suspended particles, sediments and asiatic clams (*Corbicula fluminea*) of the Río de la Plata estuary, Argentina. Environmental Pollution 99: 1-11.

Block SS (2001). Disinfection, sterilization, and preservation, 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins.

Bolognesi C, Buschinib A, Branchib E, Carbonib P, Furlinib M, Martinob A, Monteverdea M, Polib P, Rossib C (2004). Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. Science of the Total Environment 333: 127 – 136.

Boltovskoy D, Cataldo D (1999). Population dynamics of *Limnoperna fortunei*, an invasive fouling mollusc, in the lower Paraná River (Argentina). Biofouling 14:255–263.

Boltovskoy D, Cataldo D (2003). Estudios de evaluación, monitoreo y análisis de medidas de control de incrustaciones de moluscos bivalvos (*Limnoperna fortunei*) en las instalaciones de la central hidroeléctrica Itaipu. Informe final de trabajos. Central Hidroeléctrica Itaipú, CHI, 1–281.

Boltovskoy D, Cataldo D, Hechem M, Matsubara A (2005). Evaluación de la colonización y control de *Limnoperna fortunei* en la Central Nuclear Embalse de Río Tercero, Córdoba. Informe final. Central Nuclear Embalse. Embalse, 1–46.

Boltovskoy D, Correa N, Cataldo D, Sylvester F (2006). Dispersion and ecological impact of the invasive freshwater bivalve *Limnoperna fortunei* in the Río de la Plata watershed and beyond. Biol Invasions 8:947–963.

Boltovskoy D, Sylvester F, Otaegui A, Leytes V, Cataldo D (2009). Environmental modulation of the reproductive activity of the invasive mussel *Limnoperna fortunei* in South America. Austral Ecol 34:719–730.

Boltovskoy D (2015). Distribution and Colonization of *Limnoperna fortunei*: Special Traits of an Odd Mussel. En *Limnoperna fortunei*, The ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel. Invading Nature - Springer International Publishing Switzerland - Springer Series in Invasion Ecology Volume 10: 301-312.

Boltovskoy D, Morton B, Correa N, Cataldo D, Damborenea C, Penchaszadeh P y Sylvester F (2015a). Reproductive Output and Seasonality of *Limnoperna fortunei*. En *Limnoperna fortunei*, The ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel. Invading Nature - Springer International Publishing Switzerland - Springer Series in Invasion Ecology Volume 10: 77-104.

Boltovskoy D, Mengzhen X y Daisuke Nakano (2015b). Impacts of *Limnoperna fortunei* on Man-Made Structures and Control Strategies: General Overview. En: *Limnoperna fortunei*, The ecology, distribution and control of a swiftly

spreading invasive fouling mussel. *Invading Nature - Springer International Publishing Switzerland - Springer Series in Invasion Ecology Volume 10*: 375-394.

Bonel N, Solari LC, Lorda J (2013). Differences in density, shell allometry and growth between two populations of *Limnoperna fortunei* (Mytilidae) from the Río de la Plata basin, Argentina. *Malacologia* 56:43–58.

Bourrelly P (1972). Les Algues d' eau Douce. Initiation á la Systématique. Tome I-III. [3 Vols.]. Tome I: Les Algues Vertes. Tome II: Les Algues jaunes et brunes Chrysophycées, Phéophycées, Xantophycées et Diatomées. Tome III: Les Algues bleues et rouges Les Eugléniens, Peridiniens et Cryptomonadines. Collection "Faunes et Flores Actuelles; Vol. 1-3). Publicado por Paris, Éditions N. Boubée & Cie 1966-70.

Brugnoli E, Clemente J, Boccardi L, Borthagaray A, Scarabino F (2005). Golden mussel *Limnoperna fortunei* (Bivalvia: Mytilidae) distribution in the main hydrographical basins of Uruguay: update and predictions. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 77:235–244.

Brugnoli E, Dabiez MJ, Clemente JM, Muniz P (2011). *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857) en el sistema de embalses del Río Negro, Uruguay. *Oecologia Australis* 15:576–592.

Butler R (1987). Determination of the 48 hour median effect concentration (EC50) of Oxymaster to the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in terms of larval survival and development. Unpublished report CO1643-M/EV8687., Cheshire, UK.

Calazans SHC, Americo JA, Fernandes FD, Aldridge DC, Rebelo MD (2013). Assessment of toxicity of dissolved and microencapsulated biocides for control of the golden mussel *Limnoperna fortunei*. *Mar Environ Res* 91:104–108

Cardoso C da C (2014). Predadores ou dispersores? A relação do mexilhão-dourado *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia, Mytilidae) com quatro espécies de quelônios (Reptilia, Testudines) da planície costeira do Brasil subtropical. Fundação Universidade de Rio Grande. Dissertação de Mestrado.

Cataldo D, Boltovskoy D y Pose M (2003). Toxicity of chlorine and three nonoxidizing molluscicides to the pest mussel *Limnoperna fortunei*. *Journal (American Water Works Association)*, 95(1), 66-78. Retrieved September 5, 2021, from <http://www.jstor.org/stable/41298216>

Cataldo D, Boltovskoy D, Hermosa JL, Canzi C (2005). Temperature-dependent larval development rates of *Limnoperna fortunei* (Bivalvia: Mytilidae). *J Mollus Stud* 71:41–4.

Cataldo D, O'Farrell I, Paolucci E, Sylvester F, Boltovskoy D (2012a). Impact of the invasive golden mussel (*Limnoperna fortunei*) on phytoplankton and nutrient cycling. *Aquat Invasions* 7:91–100.

Cataldo D, Vinocur A, O'Farrell I, Paolucci E, Leites V, Boltovskoy D (2012b). The introduced bivalve *Limnoperna fortunei* boosts *Microcystis* growth in Salto Grande Reservoir (Argentina): evidence from mesocosm experiments. *Hydrobiologia* 680:25–38.

Cataldo D (2015). Trophic Relationships of *Limnoperna fortunei* with Adult Fishes. En *Limnoperna fortunei*, The ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel. *Invading Nature - Springer International Publishing Switzerland - Springer Series in Invasion Ecology Volume 10*: 231-248.

Cepero E (2003). Control de *Limnoperna fortunei*. Infestación de plantas potabilizadoras de agua. En: 13 Congreso Argentino de Saneamiento y Medio Ambiente, Buenos Aires.

Choi SS, Kim JS (1985). Studies on the metamorphosis and the growth of larva in *Limnoperna fortunei*. *Korean J Malacol* 1:13–18 (En coreano)

Claudi R y Oliveira MD (2015). Chemical Strategies for the Control of the Golden Mussel (*Limnoperna fortunei*) in Industrial Facilities. En *Limnoperna fortunei*, The ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel. *Invading Nature - Springer International Publishing Switzerland - Springer Series in Invasion Ecology Volume 10*: 417-442.

Clemente JM, Brugnoli E (2002). First record of *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) in continental waters of Uruguay (Río Negro and Río Yi). *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay* 13:29–33

Conde D, Paradiso M, Gorga J, Brugnoli E, De Leon L, Mandiá M (2002). Problemática de la calidad de agua em el sistema de grandes embalses del Río Negro (Uruguay). *Revista CIER* 39:51–68.

- Conroy J, Culver DA (2005).** Do dreissenid mussels affect Lake Erie ecosystem stability processes? *Am Midland Nat* 153:20–32.
- Correa N, Sardina P, Perepelizin P, Boltovskoy D (2015).** *L. fortunei* colonies: structure, distribution and dynamics En *Limnoperna fortunei*, The ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel. *Invasive Nature - Springer International Publishing Switzerland - Springer Series in Invasion Ecology Volume 10*: 119-146.
- Coughlan (1969).** The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. *Marine Biol.* 2: 356-358.
- Darrigran G y Pastorino G (1993).** Bivalvos Invasores en el Río de la Plata, Argentina. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay* 7 (64-65): 309-313.
- Darrigran G (1995).** *Limnoperna fortunei*: ¿un problema para los sistemas naturales de agua dulce del Mercosur? *Museo (Revista de la Fundación Museo de La Plata "Francisco Pascasio Moreno")* 5:85–87.
- Darrigran GA, Martin SM, Gullo B, Armendariz L (1998).** Macroinvertebrates associated with *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia, Mytilidae) in Río de la Plata, Argentina. *Hydrobiologia* 367:223–230.
- Darrigran G, Penschazadeh P y Damborenea C (1999).** The reproductive cycle of *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) from a neotropical temperate locality. *Journal Shellfish Research* 18(2):361-365.
- Darrigran G y Ezcurra de Drago I (2000).** Invasion of *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) in America. *Nautilus* 114 (2): 69-74.
- Darrigran G, Damborenea C (2001).** Concentraciones letales de un biocida para adultos del molusco invasor *Limnoperna fortunei* (Mytilidae). In: *Seminario Internacional - Gestión Ambiental e Hidroelectricidad, Salto Grande*.
- Darrigran G (2002).** Potential impact of filter-feeding invaders on temperate inland freshwater environments. *Biol Invasions* 4: 145–156.
- Darrigran G, Damborenea C, Penschazadeh P, Taraborelli C (2003).** Reproductive stabilization of *Limnoperna fortunei* (Bivalvia: Mytilidae) after ten years of invasion in the Americas. *J Shellfish Res* 22: 141–146.
- Darrigran G, Pastorino G (2004).** Distribution of the golden mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Family Mytilidae) after 10 years invading America. *J Conchol Special Publication* 3: 95–102.
- Darrigran G, Damborenea C (2005).** A bioinvasion history in South America. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), the golden mussel. *Am Malacol Bull* 20: 105–112.
- Darrigran G, Damborenea C (2006a).** Aspectos generales vinculados a la prevención y control. En *Bio-invasión del mejillón dorado en el continente americano / Gustavo Darrigran y Cristina Damborenea - 1a ed. - La Plata: Univ. Nacional de La Plata*, 10: 155-167.
- Darrigran G, Damborenea C (2006b).** Características de la especie. En *Bio-invasión del mejillón dorado en el continente americano / Gustavo Darrigran y Cristina Damborenea - 1a ed. - La Plata: Univ. Nacional de La Plata*, 3: 55-70.
- Darrigran G, Dreher Mansur MC (2006).** Distribución, Abundancia y Dispersión. En *Bio-invasión del mejillón dorado en el continente americano / Gustavo Darrigran y Cristina Damborenea - 1a ed. - La Plata: Univ. Nacional de La Plata*, 6:93-110.
- Darrigran G, Damborenea C, Greco N (2007).** Freshwater invasive bivalves in man-made environments: A case study of larvae biology of *Limnoperna fortunei* in a Hydroelectric Power Plant in South America. *Ambio* 36: 575–579.
- Darrigran G, Damborenea C, Drago EC, Ezcurra de Drago I, Paira A (2011).** Environmental factors restrict the invasion process of *Limnoperna fortunei* (Mytilidae) in the Neotropical region: A case study from the Andean tributaries. *Annales de Limnologie–Int J Limnol* 47:221–229.
- Darrigran G, Damborenea C (2011).** Ecosystem Engineering Impact of *Limnoperna fortunei* in South America. *Zoological science*. 28. 1-7.
- Darrigran GA, Damborenea C, Drago EC, Ezcurra de Drago I, Paira A, Archuby F (2012).** Invasion process of *Limnoperna fortunei* (Bivalvia: Mytilidae): The case of Uruguay River and emissaries of the Esteros del Iberá Wetland, Argentina. *Zoologia* 29:531–539.

De Madrignac Belledonne T y Oviedo Benitez (2012). El Mejillón Dorado en la Itaipu Binacional. X SEMINARIO DEL SECTOR ELECTRICO PARAGUAYO - CIGRÉ 19, 20 y 21 de Septiembre de 2012.

Deaton LE, Derby JGS, Subhedar N, Greenberg MJ (1989). Osmoregulation and salinity tolerance in two species of bivalve mollusc: *Limnoperna fortunei* and *Mytilopsis leucophaeta*. *J Exp Mar Biol Ecol* 133:67–79.

Drago EC, Wantzen KM, Paira AR (2008). The Lower Paraguay River-floodplain habitats in the context of the fluvial hydrosystem approach. *Ecology and Hydrobiology* 8:125–142.

Domínguez Henao L (2017). Disinfection by Peracetic Acid (PAA): evaluation of the effect of wastewater composition on PAA decay and bacterial inactivation kinetics and definition of predictive models. Politecnico Di Milano Department Of Civil And Environmental Engineering – Environmental Area Doctoral Program In Environmental and Infrastructure Engineering Xxx Cycle.

Domínguez Henao L, Turolla A, Antonelli M (2018). Disinfection by-products formation and ecotoxicological effects of effluents treated with peracetic acid: A review, *Chemosphere*, Volume 213: 25-40.

Du P, Liu W, Cao H, Zhao H, Huang CH (2018). Oxidation of amino acids by peracetic acid: reaction kinetics, pathways and theoretical calculations. *Water Res.* X 1, 100002.

Dunker G (1857). Mytilacea nova collections Cumingianæ. *Proceedings of the Zoological Society of London* 24: 358–366.

European Chemicals Agency, Regulation (EU) (2015). No 528 / 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products. Assessment Report for peracetic acid.

Evers C, López J, Gómez N, Rodríguez Capítulo A, Janiot LJ (1997). Calidad de las aguas de la franja costera sur del Río de la Plata (San Fernando Magdalena). Consejo Permanente para el monitoreo de la calidad de las aguas de la franja costera sur del Río de la Plata, 157 pp.

Fachini A, Gazulha V, Pedrozo CS (2012). Os impactos do mexilhão-dourado sobre a comunidade planctônica. In: Mansur MCD, Santos CP, Pereira D, Padula Paz IC, Leite Zurita ML, Raya Rodriguez MT, Vilar Nehrke M, Aydos Bergonci PE (eds) *Moluscos límnicos invasores no Brasil. Biologia, prevenção, controle.* Redes Editora, Porto Alegre, pp 255–261

Fairhurst F (1987). Determination of the 48 hour median effect concentration (EC50) of Oxymaster to the common mussel (*Mytilus edulis*), in terms of larval survival and development. Unpublished report CO1644-M/EV8687., Cheshire, UK.

Falsanisi D, Gehr R, Santoro D, Dell'Erba A, Notarnicola M, Liberti L (2006). Kinetics of PAA demand and its implications on disinfection of wastewaters, *Water Qual. Res. J. Canada.* 41: 398–409.

Frau D, Rojas Molina F, Devercelli M, José de Paggi S (2013). The effect of an invading filterfeeding bivalve on a phytoplankton assemblage from the Paraná system: a mesocosm experiment. *Mar Freshw Behav Physiol* 45: 303–316.

Gazulha V (2010). O mexilhão dourado *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) na presença de cianobactérias: taxas de filtração, comportamento alimentar e sobrevivência. PhD Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Brazil), pp 1–104.

Gazulha V (2012). O impacto de *Limnoperna fortunei* sobre as cianobacterias. In: Mansur MCD, Santos CP, Pereira D, Padula Paz IC, Leite Zurita ML, Raya Rodriguez MT, Vilar Nehrke M, Aydos Bergonci PE (eds) *Moluscos límnicos invasores no Brasil. Biologia, prevenção, controle.* Redes Editora, Porto Alegre, pp 249–254

Gazulha V, Mansur MCD, Cybis LF, Azevedo SMFO (2012a). Feeding behavior of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) under exposure to toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. *Braz J Biol* 72:41–49

Gazulha V, Mansur MCD, Cybis LF, Azevedo SMFO (2012b). Grazing impacts of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) on single-celled, colonial and filamentous cyanobacteria. *Braz J Biol* 72:33–39

Gehr R, Cochrane D (2002). Peracetic acid (PAA) as a disinfectant for municipal wastewaters: encouraging performance results from physicochemical as well as biological effluents, *Proc. Water Environ. Fed.*, 182–198.

- Giglio M, Mansur MCD, Damborenea C, Penchaszadeh PE, Darrigran G. (2016).** Reproductive pattern of the aggressive invader *Limnoperna fortunei* (Bivalvia, Mytilidae) in South America. *Invertebrate Reproduction y Development* 60: 175–184,
- Hernández Sánchez C, González G L, Armendáriz CR, Caballero Mesa JM, Ben-Charki El-Mousati N, Hardisson de la Torre A (2011).** Trihalometanos en aguas de consumo humano. *Revista de Toxicología* (en línea); 28(2): 109-114
- Howarth J, Harvey M (2010).** Method of analyzing low levels of peroxyacetic acid in water (Patent No: US 7,651,860 B2).
- Hurtado A, Alonzo-Moya C, Ronald Hofmann R (2021).** Effectiveness of peracetic acid and EarthTec QZ for controlling zebra and quagga mussels in drinking water treatment plants on Lake Ontario *Journal of Water Supply: Research and Technology-Aqua*; 70 (1): 99–112.
- IBAMA-MMA (2017).** Ministério Do Meio Ambiente - Mma Instituto Brasileiro Do Meio Ambiente E Dos Recursos Naturais Renováveis - Ibama Diagnóstico Sobre A Invasão Do Mexilhão-Dourado (*Limnoperna Fortunei*) No Brasil Consulta Pública Outubro/2017 (En portugués)
- Iwasaki K (1997).** Climbing behaviour and tolerance to aerial exposure of a freshwater mussel, *Limnoperna fortunei*. *Venus (Jpn J Malacol)* 56:15–25.
- Iwasaki K (2015).** Behavior and Taxis of Young and Adult. En *Limnoperna fortunei*, The ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel. *Invading Nature - Springer International Publishing Switzerland - Springer Series in Invasion Ecology Volume 10: 249-260.*
- Jørgensen CB (1990).** Bivalve filter feeding: hydrodynamics, Bioenergetics, physiology and ecology. Olsen y Olsen. 140 pp.
- Karatayev AY, Boltovskoy D, Burlakova LE y Padilla DK (2015).** Parallels and Contrasts Between *Limnoperna fortunei* and Species of Dreissena. En *Limnoperna fortunei*, The ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel. *Invading Nature - Springer International Publishing Switzerland - Springer Series in Invasion Ecology Volume 10: 261-300.*
- Koivunen J, Heinonen-Tanski H (2005).** Peracetic acid (PAA) disinfection of primary, secondary and tertiary treated municipal wastewaters, *Water Res.* 39 4445–4453.
- Kimura T (1994).** The earliest record of *Limnoperna fortunei* (Dunker) from Japan. *Chiribotan (J Malacol Soc Jpn)* 25:34–35 (En japonés)
- Kitis M (2004).** Disinfection of wastewater with peracetic acid: A review, *Environ. Int.* 30: 47–55.
- Lazarova V, Janex M, Fiksdal L, Oberg C, Barcina I, Pommepuy M (1998).** Advanced wastewater disinfection technologies: Short and long term efficiency, *Water Sci. Technol.* 38: 109–117.
- Liberti L, Lopez A, Notarnicola M (1999).** Disinfection with peracetic acid for domestic sewage re-use in agriculture. *Water Environ J* 13, pp 262-268.
- Lima LL, Querol E, Oliveira EV (2008).** Ocorrência de *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mollusca, Mytilidae) no Rio Quaraí, município de Barra do Quaraí, Rio Grande do Sul, Brasil. *Biodiversidade Pampeana* 6:50–52
- Li Shiguo Li, Chen Yiyong Chen, Gao Yangchun Gao, Zhiqiang Xia, Aibin Zhan (2019).** Chemical oxidants affect byssus adhesion in the highly invasive fouling mussel *Limnoperna fortunei*, *Science of The Total Environment*, Volume 646: 1367-1375
- Liu L, You Z, Luo F, Zhang J, Ouyang S (2006).** Killing and removing *Limnoperna fortunei* from raw water pipe by isolating oxygen. *Water Wastewater Eng* 22:40–42, 47.
- Liu D-M, Wang R, Hong J, Cui F-Y, Chen W-X, Wang C-H, Chen C-X (2012).** Experimental studies of inactivation effect on *Limnoperna fortunei* with potassium permanganate. *J Harbin Inst Technol* 44:46–49.
- Liu D, Steinberg C, Straus DL, Pedersen L, Meinelt T (2014).** Salinity, dissolved organic carbon and water hardness affect peracetic acid (PAA) degradation in aqueous solutions, *Aquac. Eng.* 60: 35–40.
- Lopes M, Vieira J y Burns M (2009).** Biofouling of the golden mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) over the Anomura crab *Aegla platensis* Schmitt, 1942. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 4(2):222-225.

- Luukkonen T, Teeriniemi J, Prokkola H, Rämö J, Lassi U (2014).** Chemical aspects of peracetic acid based wastewater disinfection, *Water SA*. 40: 73–80.
- Luukkonen T, Pehkonen SO (2016).** Peracids in water treatment: A critical review, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 0: 1–39.
- Luo FM (2006).** Studies on biology and control techniques of *Limnoperna fortunei* (Dunker) in water supply system of Shenzhen city. MSc Thesis, Nanchang University (China), pp 1–108 (En chino).
- Mackie GL y Claudi R (2010).** Monitoring and control of macrofouling mollusks in fresh water systems, second edition. Boca Raton, FL: CRC Press. Mansur, M.C.D., Zani-Richinitti L.M., Santos C.P. 1999. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), spread of a bivalve mollusc to Guaíba Bay, Rio Grande do Sul, Brazil. *Biociências* 7:147–149.
- Magara Y, Matsui Y, Goto Y, Yuasa A (2001).** Invasion of the non-indigenous nuisance mussel, *Limnoperna fortunei*, into water supply facilities in Japan. *J Water Supply: Res Technol—Aqua* 50:113–124.
- Malchesky PS (2008).** Peracetic Acid and Its Application to Medical Instrument Sterilization, *Artif. Organs*. 17 (2008) 147–152.
- Mansur, MCD, Zani-Richinitti LM, Santos CP (1999).** *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), spread of a bivalve mollusc to Guaíba Bay, Rio Grande do Sul, Brazil. *Biociências* 7:147–149.
- Mansur M, Santos C, Darrigran G, Heydrich I, Callil C y Cardoso F (2003).** Primeiros dados quali-quantitativos do mexilhão-dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker), no Delta do Jacuí, no Lago Guaíba e na Laguna dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil e alguns aspectos de sua invasão no ambiente. *Revista Brasileira de Zoologia* 20 (1): 75-84.
- Mansur MCD, Santos CP, Richinitti LM; Pereira D, Batista CB, Silveira MB, Alberto RMF, Silva MCP (2008).** Ocorrência de moluscos límnicos e crustáceos em macroaglomerados do mexilhão dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) sobre sarandi no Lago Guaíba (RS, Brasil). *Biotemas* 21(4):179-182.
- Mansur MCD, Pimpão DM, Bergonci PEA, Santos CP y Figueiredo GCS (2012).** Morfologia e ciclo larval comparados de bivalves límnicos invasores e nativos. In Mansur, M. C. 101 D., C. P. Santos, D. Pereira, I. C. P. Paz, M.L. L. Zurita, M. T. R. Rodriguez, M. V. Nehrke y P. E. A. Bergonci (org), *Moluscos Límnicos Invasores no Brasil: Biología, Prevenção, Cokontrol.* Redes Editora, Porto Alegre: 95–110.
- Maroñas M y Damborenea C (2006).** Efecto de biocidas y tolerancia a la exposición al aire. En *Bio-invasión del mejillón dorado en el continente americano / Gustavo Darrigran y Cristina Damborenea - 1a ed. - La Plata: Univ. Nacional de La Plata*, 11: 167-180.
- Martinez VMB, Fernandez V, Giannuzzi L (2017).** Efectividad de un proceso de remoción de fitoplancton, cianobacterias y bacterias heterótrofas aplicado en una planta potabilizadora de agua. VI Taller *Cianobacterias toxígenas en argentina*.
- Martinez VMB, Fernandez V, Giannuzzi L (2019).** Analisis comparativo de fitoplancton y cianobacterias en una planta potabilizadora. VIII Taller *Cianobacterias toxígenas en argentina*.
- Matschke VM (2020).** Análisis de situación de las acciones de manejo ambiental frente a bioinvasiones acuáticas: el caso del mejillón dorado *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) en el Río de La Plata, Argentina. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina.
- Monarca S, Richardson S, Feretti D, Grottolo M, Thruston A, Zani C (2002).** *Mutagenicity and disinfection by-products in surface drinking water disinfected with peracetic acid.* *Environmental Toxicology & Chemistry* 21: 309 – 318.
- Montalto L, Ezcurra de Drago I (2003).** Tolerance to desiccation of an invasive mussel, *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia, Mytilidae), under experimental conditions. *Hydrobiologia* 498:161–167
- Montalto L y Marchese M (2003).** *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) tolerance to temperature and pH in experimental conditions. *Neotropica* 49: 26-34.
- Montesor LC, Miranda-Filho KC, Paglia A, Luz DM, Araujo JM, Silva MJS, Gerhard L, Martinez CB, Vidigal TH (2013).** Short-term toxicity of ammonia, sodium hydroxide and a commercial biocide to golden mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857). *Ecotoxicol Environ Saf* 92:150–154

- Morton B (1973).** Some aspects of the biology and functional morphology of the organs of feeding and digestion of *Limnoperna fortunei* (Dunker) (Bivalvia: Mytilacea). *Malacologia* 12:265– 281
- Morton B (1975).** The colonization of Hong Kong's raw water supply system by *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857) (Bivalvia: Mytilacea) from China. *Malacol Rev* 8:91–105
- Morton B, Au CS, Lam WW (1976).** Control of *Limnoperna fortunei*. *J Inst Water Eng Sci* 30:147– 156
- Morton B (1982).** Some aspects of the population structure and sexual strategy of *Corbicula cf. fluminalis* (Bivalvia: Corbiculacea) from the Pearl River, People's Republic of China. *J Mollus Stud* 48:1–23
- Morton B (2015).** The Biology and Anatomy of *Limnoperna fortunei*, a Significant Freshwater Bioinvader: Blueprints for Success. En *Limnoperna fortunei*, The ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel. *Invading Nature - Springer International Publishing Switzerland - Springer Series in Invasion Ecology Volume 10*: 3-42.
- Nakano D, Kobayashi T, Sakaguchi I (2010).** Predation and depth effects on abundance and size distribution of an invasive bivalve, the golden mussel *Limnoperna fortunei*, in a dam reservoir. *Limnology* 11:259–266.
- Nalco Inc. (2013).** Drinking water golden mussel control. Case study—drinking water CH-1568. pp 1–2
- Oliveira M y Barros L (2003).** Mexilhão dourado no Pantanal. Um problema ambiental e econômico. EMBRAPA, p. 1-3 ([http:// www.cpap.embrapa.br](http://www.cpap.embrapa.br)).
- Oliveira MD, Calheiros DF, Jacobi CM, Hamilton SK (2011).** Abiotic factors controlling the establishment and abundance of the invasive golden mussel *Limnoperna fortunei*. *Biol Invasions* 13:717–72
- Oliveira MD, Campos M, Paolucci E, Mansur MCD y Hamilton SK (2015).** Colonization and Spread of *Limnoperna fortunei* in South America. En *Limnoperna fortunei*, The ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel. *Invading Nature - Springer International Publishing Switzerland - Springer Series in Invasion Ecology Volume 10*: 333-356.
- Orta de Velásquez M, Yáñez-Noguez I, Jiménez-Cisneros B, Luna Pabello VM (2017).** Adding silver and copper to hydrogen peroxide and peracetic acid in the disinfection of an advanced primary treatment effluent, *Environ. Technol.* 29: 1209–1217.
- Pareschi DC, Matsumura-Tundisi T, Medeiros GR, Luzia AP, Tundisi JG (2008).** First occurrence of *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) in the Rio Tietê watershed (São Paulo State, Brazil). *Braz J Biol* 68:1107–1114.
- Pastorino G, Darrigran G, Martin S y Lunaschi L (1993).** *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mytilidae), nuevo bivalvo invasor en aguas del Río de la Plata. *Neotropica* 39: 34.
- Pedersen LF, Pedersen PB, Nielsen JL, Nielsen PH (2009).** Peracetic acid degradation and effects on Disinfection by peracetic acid (PAA): Evaluation of the effect of wastewater composition on PAA decay and bacterial inactivation kinetics and definition of predictive models nitrification in recirculating aquaculture systems, *Aquaculture.* 296: 246–254.
- Pedersen LF, Meinelt T, Straus DL (2013).** Peracetic acid degradation in freshwater aquaculture systems and possible practical implications, *Aquac. Eng.* 53: 65–71.
- Penchaszadeh PE, Darrigran GA, Angulo C, Averbuj A, Brögger M, Dogliotti A, Pírez N (2000).** Predation of the invasive freshwater mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mytilidae) by the fish *Leporinus obtusidens Valenciennes*, 1846 (Anostomidae) in the Rio de la Plata, Argentina. *J Shellfish Res* 19:229–231.
- Pereira D (2014).** Bivalves Limnícolas em Regiões Hidrográficas e Ecorregiões na América do Sul e Subsídios para o Controle do Bivalve Invasor *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Tese de Doutorado.
- Perepelizin PV (2011).** Alternativas ambientalmente inocuas (no químicas) para el control del mejillón incrustante *Limnoperna fortunei* en instalaciones industriales. PhD Thesis, Universidad de Buenos Aires (Argentina), 1–126.
- Perepelizin PV, Boltovskoy D (2011).** Resistance of the invasive pest mussel *Limnoperna fortunei* to anoxia. *Journal of the American Waterworks Association (AWWA)* 103: 79-85.
- Pérez MC y Stupak M (1996).** Revisión sobre los aspectos biológicos del fouling. La Plata: Anales CIDEPINT, 95-154.

- Pestana D, Ostrensky A, Pereira Boeger WA, Pie MR (2009).** The effect of temperature and body size on filtration rates of *Limnoperna fortunei* (Bivalvia, Mytilidae) under laboratory conditions. *Braz Arch Biol Technol* 52:135–144
- Pestana D, Ostrensky A, Tschá MK, Boeger WA (2010).** Prospecção do molusco invasor *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) nos principais corpos hídricos do estado do Paraná, Brasil. *Papeis Avulsos de Zoologia* 50:553–559.
- Porta A (2001).** Expresión de biomarcadores de contaminación ambiental en organismos acuáticos bonaerenses. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* XXXV, 261e271.
- Ramírez Quiroz (2005).** Tratamiento de Desinfección del Agua Potable Empleo de cloro, hipoclorito, dióxido de cloro, cloraminas, ozono y permanganato potásico. Subproductos de la desinfección. Canal de Isabel II. Editorial Canal Educa.
- Rajagopal S (2002).** Effects of low-level chlorination on zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, *Water Research* 36: 3029–3034.
- Rajagopal S, Van der Velde G, Van der Gaag M, Jenner HA (2003).** How effective is intermittent chlorination to control adult mussel fouling in cooling water systems? *Water Res.*; 37(2):329-338.
- Ricciardi A (1998).** Global range expansion of the Asian mussel *Limnoperna fortunei* (Mytilidae): another fouling threat to freshwater systems. *Biofouling* 13:97–106.
- Riisgård HU (2001).** On measurement of filtration rates in bivalves —the stony road to reliable data: review and interpretation. *Marine Ecology Progress Series* 211: 275–291.
- Rojas Molina F, Paggi JC, Devercelli M (2010).** Zooplanktonphagy in the natural diet and selectivity of the invasive mollusk *Limnoperna fortunei*. *Biol Invasions* 12:1647–1659.
- Rojas Molina F, Jose de Paggi SB, Frau D (2012).** Impacts of the invading golden mussel *Limnoperna fortunei* on zooplankton: a mesocosm experiment. *Zool Stud* 51:733–744.
- Rückert G, Campos MCS, Rolla ME (2004).** Alimentação de *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857): taxas de filtração com ênfase ao uso de Cyanobacteria. *Acta Scientiarum* 26:421–429.
- Rudd T, Hopkinson L (1989).** Comparison of disinfection techniques for sewage and sewage effluents. *Journal of the Institution of Water Environmental Management* 3, pp 612 – 618.
- Rutala WA, Weber DJ (1999).** Infection control: the role of disinfection and sterilization. *The Journal of hospital infection*, 43 Suppl, S43-55.
- San Giacomo R y Wymer MW (1997).** Successful applications of zebra mussel treatment, excluding chlorine. In: *Zebra mussels and aquatic nuisance species*, ed.F. M. D'Itri, 501-506, Chelsea, MI: Ann Arbor Press.
- Sanchez-Ruiz C, Martinez-Royano S, Tejero-Monzon I (1995).** An evaluation of the efficiency and impact of raw WW disinfection with PAA prior to Ocean discharge, *Water Sci. Technol.* 32: 159–166.
- Santos CP, Würdig NI, Mansur MC (2005).** Fases larvais do mexilhão dourado *Limnoperna fortunei* (Dunker) (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae) na baía do Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 22:702–708.
- Santos CP, Raya Rodriguez MT, Mansur MCD, Vilar Nehrke M, Leite Zurita ML (2012a)** Controle de *Limnoperna fortunei* com aplicação de radiação ultravioleta. En: Mansur MCD, Santos CP, Pereira D, Padula Paz IC, Leite Zurita ML, Raya Rodriguez MT, Vilar Nehrke M, Aydos Bergonci PE (eds) *Moluscos límnicos invasores no Brasil. Biología, prevenção, controle*, Redes Editora, Porto Alegre, 335–338.
- Santos CP, Vicenzi J, Berutti FA, Mansur MCD, Perez Bergmann C, Raya Rodriguez MT, Vilar Nehrke M, Leite Zurita ML (2012b)** Controle de bivalves com a utilização do ultrassom. In: Mansur MCD, Santos CP, Pereira D, Padula Paz IC, Leite Zurita ML, Raya Rodriguez MT, Vilar Nehrke M, Aydos Bergonci PE (eds) *Moluscos límnicos invasores no Brasil. Biología, prevenção, controle*, Redes Editora, Porto Alegre, 339–341.
- Sardiña P, Cataldo D, Boltovskoy D (2009).** Effects of conspecifics on settling juveniles of the invasive golden mussel, *Limnoperna fortunei*. *Aquatic Sci* 71:479–486.
- Scarabino F, Verde M (1994).** *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) en la costa Uruguaya del Rio de la Plata (Bivalvia, Mytilidae). *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay* 7:374–375.

- Serra AE, Toschi NO, Lupano EM (1992).** Río de La Plata: calidad de aguas en la franja costera sur (San Isidro e Magdalena). AGOSBAOSN-SIHN, 167 pp
- Serveis de Vigilància Ambiental Qualitat i Intervenció Ambiental (2014).** Los trihalometanos (THM) en el agua de consumo Documento informativo Agència de Salut Pública de Barcelona. Informes anuales sobre el estado de salud de la ciudad. http://www.aspb.cat/quefem/documents_informes_salut_barcelona.htm
- Soares MF, Pereira D, Santos CP, Mansur MCD, Pires M, Breitenbach JO, Grespan C (2009)** Toxicidade do sulfato de cobre ao mexilhão dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), em água bruta. J Braz Soc Ecotoxicol 4:37–48.
- Sol Sánchez D, Laca Pérez A, Andreu PS, Abellán Soler M, Gil Muñoz MI, García Fernández F, Solano Martos YL, Rancaño Pérez A (2020).** Ácido peracético como alternativa para una efectiva desinfección de aguas residuales en EDAR. Tecnoaqua diciembre 2020.
- Spaccesi F, Rodrigues Capitulo A (2012)** Benthic communities on hard substrates covered by *Limnoperna fortunei* Dunker (Bivalvia, Mytilidae) at an estuarine beach (Río de la Plata, Argentina). J Limnol 71:144–153.
- Spaccesi F (2013).** Abundance, recruitment, and shell growth of the exotic mussel *Limnoperna fortunei* in the Río de la Plata (Argentina). Zoological Studies 52: 1–11
- Spellman F (2014).** Water and wastewater treatment operations, London: CRC Press.
- Stampi S, De Luca, G, Zanetti F (2001).** Evaluation of the efficiency of peracetic acid in the disinfection of sewage effluents. Journal of Applied Microbiology 91: 833 – 841.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd Edition (2012).** ISBN: 9780875530130. Author: E.W. Rice, R.B. Baird, A.D. Eaton, L.S. Clesceri, editors. Publisher: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Publication date: 2012.
- Sylvester F, Dorado J, Boltovskoy D, Juárez A, Cataldo D (2005).** Filtration rates of the invasive pest bivalve *Limnoperna fortunei* as a function of size and temperature. Hydrobiologia 534: 71–80.
- Sylvester F (2006).** Biología alimentaria y ecología del molusco invasor *Limnoperna fortunei* (Mytilidae) en el Paraná inferior y Río de la Plata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Sylvester F, Boltovskoy D y Cataldo D (2006).** Tasas de clareado: ritmos e impacto. En Bio-invasión del mejillón dorado en el continente americano / Gustavo Darrigran y Cristina Damboronea - 1a ed. - La Plata: Univ. Nacional de La Plata, 8: 129-140.
- Sylvester F, Boltovskoy D, Cataldo D (2007a).** Fast response of freshwater consumers to a new trophic resource: Predation on the recently introduced Asian bivalve *Limnoperna fortunei* in the lower Parana River, South America. Austral Ecol 32:403–415.
- Sylvester F, Boltovskoy D, Cataldo D (2007b).** The invasive bivalve *Limnoperna fortunei* enhances benthic invertebrate densities in South American floodplain rivers. Hydrobiologia 589:15–27.
- Sylvester F, Cataldo D, Notaro C, Boltovskoy D (2013)** Fluctuating salinity improves survival of the invasive freshwater golden mussel at high salinity: implications for the introduction of aquatic species through estuarine ports. Biol Invasions 15:1355–1366.
- Takeda AM, Mansur MCD, Fujita DS, Bibian JPM (2003)** Occurrence of an invasive species, the golden mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), in two small reservoirs near Curitiba, PR. Acta Biologica Leopoldensia 25:251–254.
- Tasayco Chiroque M (2011).** Uso del peróxido de hidrógeno para el tratamiento de efluentes industriales. Universidad Nacional de Ingeniería de Lima. <http://cybertesis.uni.edu.pe/handle/uni/18042>
- Tchobanoglous G, Trusell R, Hand D, Crittenden J y Howe K (2012).** Principles of water treatment. London:Wiley.
- Uryu K, Iwasaki K, Hinoue M (1996)** Laboratory experiments on behaviour and movement of a freshwater mussel, *Limnoperna fortunei* (Dunker). J Mollus Stud 62:327–341 Veitenheimer-Mendes I (1981) Corbicula manilensis, (Philippi, 1844) molusco asiático, na bacia do Jacuí do Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil (Bivalvia, Corbiculidae). Iheringia (Série Zoologia) 60:63–74.

- Utermohl H (1958).** Zur Ver vollkommung der quantitativen phytoplankton-methodik. Mitteilung Internationale Vereinigung Fuer Theoretische unde Amgewandte Limnologie, 9, 39 p.
- Wagner W, Brumelis D, Gehr R (2002).** Disinfection of wastewater by hydrogen peroxide or peracetic acid: development of procedures for measurement of residual disinfectant and application to a physicochemically treated municipal effluent., Water Environ. Res. 74: 33–50.
- Van Benschoten JE, Jensen JN, Lewis D y Brady TJ (1993).** Chemical oxidants for controlling zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): A synthesis of recent laboratory and field studies. In: Zebra mussels: Biology, impacts, and control, ed. T. F. Nalepa and D. W. Schloesser, 599-619. Boca Raton, FL: Lewis Publishers.
- Vegega y Manissero (1996).** Method for controlling dressendae mussels. FMC Corporation, Philadelphia, Pa.; The Research Foundation of the State University of N.Y., Buffalo, N.Y. Patente US005550157A
- Verween A, Vincx M y Degraer C (2009).** Comparative toxicity of chlorine and peracetic acid in the biofouling control of *Mytilopsis leucophaeata* and *Dreissena polymorpha* embryos (Mollusca, Bivalvia). International Biodeterioration y Biodegradation 63: 523-528.
- Villar C, Stripeikis J, D’Huicque L, Tudino M, Troccoli O, Bonetto C (1999)** Cd, Cu and Zn concentrations in sediments and the invasive bivalves *Limnoperna fortunei* and *Corbicula fluminea* at the Rio de la Plata basin, Argentina. Hydrobiologia 416:41–49.
- Xu M, Wang ZY, Duan XZ (2009)** Prevention and treatment of the freshwater mussel in watertransmission line. Water Wastewater Eng 35:205–208.
- Young SS, Yang HN, Huang DJ, Liu SM, Huang YH, Chiang CT, Liu JW (2014)** Using benthic macroinvertebrate and fish communities as bioindicators of the Tanshui River Basin around the greater Taipei area—multivariate analysis of spatial variation related to levels of water pollution. Int J Environ Res Public Health 11:7116–7143.
- Yuan Z, Ni Y, Van Heiningen ARP (1997a).** Kinetics of peracetic acid decomposition: Part I: Spontaneous decomposition at typical pulp bleaching conditions, Can. J. Chem. Eng. 75: 37–41.
- Yuan Z, Ni Y, Van Heiningen ARP (1997 b).** Kinetics of the peracetic acid decomposition: Part II: pH effect and alkaline hydrolysis, Can. J. Chem. Eng. 75: 42–47.
- Zhao X, Cheng K, Hao J, Liu D (2008).** Preparation of peracetic acid from hydrogen peroxide, part II: Kinetics for spontaneous decomposition of peracetic acid in the liquid phase, J. Mol. Catal. A Chem. 284: 58–68.
- Zanella O, Marenda LD (2002)** Ocorrência de *Limnoperna fortunei* na Central Hidrelétrica de Itaipu. In: V Congresso Latinoamericano de Malacologia, São Paulo (Brazil).
- Zihon-Lukanina EA, Alimov AF y Sanina LV (1990).** Filtering activity and nutrition. Trudy Zoologicheskogo Instituta Akademii Nauk SSSR 219:141-152 (En ruso).
- Zhuang MQ (2006).** “Study of growth rhythm and controlling of mollusks in long distance water transfer pipelines (Report).” The East River Water Source Project Management Division of Shenzhen. (En chino).