

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**EFFECTOS DE METALES PESADOS SOBRE  
INVERTEBRADOS BENTÓNICOS**

Paola Judith Pavé

Directora de Tesis: Dra. Mercedes R. Marchese

Co-directora de Tesis: Dra. Ma. Alejandra Maine

Lugar de realización:

Laboratorio de Bentos – Instituto Nacional de Limnología – CONICET-UNL

**-2012-**

# Páginas preliminares

---

*A mis padres*

## ***Agradecimientos***

La realización de la presente Tesis fue posible principalmente gracias a las becas otorgadas por el CONICET, las cuales me permitieron iniciar y completar mi estudio de doctorado.

Agradezco a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL), sede del Doctorado en Ciencias Biológicas, por la admisión a la carrera doctoral. Gracias también por la buena predisposición para la realización de los trámites así como por las consultas, especialmente a Gachi Lucca y Adriana Ortolani.

Al Instituto Nacional de Limnología (CONICET- UNL), por permitirme realizar mi Tesis en sus instalaciones, facilitándome los equipamientos, instrumentales y bibliografía requerida para tal fin. Dicho instituto no solo enriqueció mi trabajo de Tesis, sino también mi persona, porque encontré gente muy amable, dispuesta y compañera, ámbito imprescindible para trabajar adecuadamente. Por lo tanto agradezco a cada una de las personas que me brindaron su ayuda y tiempo. A los técnicos: Ramón, Esteban, Eduardo y Cristian. A Alicia Loteste por los análisis químicos, a Graciela Paporello por ayudarme a separar oligoquetos hasta largas horas de la noche y a Lionel M. por los análisis de granulometría. A Susana Gervasio (INTEC) por las determinaciones de metales. Muy agradecida a mis compañeras de laboratorio de bentos, especialmente a Luciana Montalto y Florencia Zilli, por tanta ayuda y apoyo durante estos años. A mis compañeros/as y colegas de los restantes laboratorios que también me brindaron su ayuda, aliento o simplemente compartieron conmigo tiempo de trabajo, entre ellos, Pablo Scarabotti, Pablo Collins, Susana José de Paggi, Tito Paggi, Ana María Gagnetten, Martín Blettler, Florencia Gutiérrez, Miguel Saigo, Luis Espínola y Elena Córdoba.

Esta carrera de investigación que intento transitar con entusiasmo y dedicación tiene sus mentoras, quienes me permitieron crecer día a día a nivel profesional y personal, contagiándome de dichas cualidades mencionadas, ellas son Mercedes Marchese, Inés Ezcurra de Drago y María Alejandra Maine.

Mis comienzos en esta línea de investigación, desde la carrera de grado, fueron gracias al incentivo, apoyo constante y principalmente la confianza brindada por mi

directora Mercedes M., a quien considero mi mentora y admiro profundamente por su calidez humana y dedicación. Gracias por guiarme y transmitirme sus conocimientos. Por incluirme en los proyectos, los cuales me permitieron realizar parte de esta tesis, los mismos son:

- Proyecto CAI+D`03-UNL: “*Evaluación de respuestas de protistas, invertebrados y macrófitas a perturbaciones en el Río Salado del Norte*”. Santa Fe. Directora Prof. Mercedes Marchese. Período de desarrollo: 2004-2006.
- Proyecto PICTO-2003. ANPCyT-UNL. “*Análisis de perturbaciones antropogénicas e hidrológicas sobre la biodiversidad del río Salado del Norte (Santa Fe)*”. Directora Prof. Mercedes Marchese. Período de desarrollo: 2004-2007.
- Proyecto CAI+D`06-UNL: “*Invertebrados bentónicos de humedales del río Paraná Medio*”. Directora Prof. Mercedes Marchese. Período de desarrollo: 2006-2009.

A Inés E.D., a quien conocí en esta instancia doctoral, quien aceptó y confió en dirigirme durante la beca Tipo I-CONICET. Agradezco su constante ayuda, y sobre todo el aliento que significó mucho en los momentos difíciles atravesados, sus palabras han sido caricias al alma.

A M. Alejandra M., mi co-directora a quien conocí también durante esta etapa doctoral, gracias por la ayuda en las cuestiones químicas de esta Tesis, que significó un gran alivio, ya que trasmite sus conocimientos con tal sencillez y paciencia, lo cual generó una curiosidad y atracción por la química que antes no tenía. Además, al igual que Mercedes e Inés, ha hecho que esta etapa sea amena y llevadera, por la amabilidad y aliento constante.

Finalmente, agradezco a mi familia, por su apoyo y comprensión, tratando de entender esta carrera tan particular, con sus tiempos tan distintos a la de los demás. De la misma manera mis agradecimientos a mis amigas y amigos, algunos de ellos colegas, que con su apoyo constante, aliento, comprensión y cariño, han hecho que atravesase esta etapa con mucho placer. En especial quiero agradecer por la ayuda tan importante para la confección de este manuscrito, a Pamela Zamboni y Diego Fállico.

*La verdadera grandeza de la ciencia acaba valorándose por su utilidad.*

*Gregorio Marañón*

## **INDICE GENERAL**

<b>Publicaciones y comunicaciones</b>	<b>1</b>
<b>Índice de Tablas</b>	<b>3</b>
<b>Índice de Figuras</b>	<b>5</b>
<b>I. RESUMEN</b>	<b>11</b>
<b>II. ABSTRACT</b>	<b>15</b>
<b>III. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>18</b>
<b>III.I. Estado actual del conocimiento del tema</b>	<b>18</b>
<b>III.II. Criterios seguidos para la evaluación de los efectos de metales         a distintos niveles de organización</b>	<b>23</b>
<b>III.III. Características y antecedentes sobre el área de estudio</b>	<b>25</b>
<b>III.IV. Metales estudiados</b>	<b>27</b>
<b>III.V. Objetivo General</b>	<b>30</b>
<b>CAPÍTULO 1: Análisis del efecto de metales (Cu, Cr y Pb) sobre macroinvertebrados bentónicos en el río Salado del Norte. Estudio a campo.</b>	<b>31</b>
<b>1.1. Introducción</b>	<b>31</b>
<b>1.2. Objetivos e hipótesis</b>	<b>33</b>
<b>1.3. Materiales y métodos</b>	<b>34</b>
1.3.1. Caracterización del área de estudio	<b>34</b>
1.3.2. Selección de las estaciones de muestreo	<b>35</b>
1.3.3. Determinaciones de variables físico-químicas y químicas, en agua y sedimentos	<b>37</b>
1.3.4. Concentración de metales en moluscos acuáticos en	

humedales	<b>38</b>
1.3.5. Muestreos del bentos e identificación de los macroinvertebrados bentónicos	<b>40</b>
1.3.6. Análisis cuali y cuantitativo del bentos	<b>41</b>
<b>1.4. Resultados</b>	<b>42</b>
1.4.1. Caracterización del agua	<b>42</b>
1.4.2. Caracterización del sedimento de fondo	<b>55</b>
1.4.3. Concentraciones de metales en agua y sedimentos	<b>56</b>
1.4.4. Concentración de Cr y Cu en moluscos acuáticos: comparación entre humedales	<b>65</b>
1.4.5. Análisis cuali y cuantitativo de los macroinvertebrados bentónicos	<b>66</b>
<b>1.5. Discusión</b>	<b>82</b>
<b>CAPÍTULO 2: Respuestas de <i>Chironomus gr. decorus</i> (Diptera- Chironomidae) a metales (Cr y Cu). Escala microcosmos</b>	<b>94</b>
<b>2.1. Introducción</b>	<b>94</b>
<b>2.2. Objetivos e hipótesis</b>	<b>96</b>
<b>2.3. Materiales y Métodos</b>	<b>97</b>
2.3.1. Experiencia 1: Efecto del Cu sobre <i>C. gr. decorus</i> : malformaciones en piezas bucales y reducción del desarrollo larval	<b>97</b>
2.3.2. Experiencia 2: Acumulación de Cu en <i>C. gr. decorus</i>	<b>100</b>
2.3.3. Experiencia 3: Efecto del Cu sobre la emergencia en <i>C. gr.</i> <i>decorus</i>	<b>103</b>
2.3.4. Experiencia 4: Efecto del Cr sobre <i>C. gr. decorus</i> : emergencia y malformaciones bucales	<b>103</b>



<b>2.4. Resultados</b>	<b>104</b>
2.4.1. Experiencia 1: Efecto del Cu sobre <i>C. gr. decorus</i> : malformaciones en piezas bucales y reducción del desarrollo larval	<b>104</b>
2.4.2. Experiencia 2: Acumulación de Cu en <i>C. gr. decorus</i>	<b>107</b>
2.4.3. Experiencia 3: Efecto del Cu sobre la emergencia de <i>C. gr. decorus</i>	<b>108</b>
2.4.4. Experiencia 4: Efecto del Cr sobre <i>C. gr. decorus</i> : emergencia y malformaciones bucales	<b>110</b>
<b>2.5. Discusión</b>	<b>113</b>
<b>CAPÍTULO 3: Toxicidad y bioacumulación del cromo en <i>Limnodrilus udekemianus</i> (Oligochaeta: Naididae). Escala microcosmos y mesocosmos.</b>	<b>120</b>
<b>3.1. Introducción</b>	<b>120</b>
<b>3.2. Objetivos e hipótesis</b>	<b>122</b>
<b>3.3. Materiales y Métodos</b>	<b>123</b>
3.3.1. Experiencia 5: Efecto del Cr sobre la supervivencia y reproducción de <i>L. udekemianus</i> , en microcosmos	<b>123</b>
3.3.2. Experiencia 6: Acumulación y eliminación de Cr por <i>L. udekemianus</i> , en mesocosmos	<b>125</b>
<b>3.4. Resultados</b>	<b>130</b>
3.4.1. Experiencia 5: Efecto del Cr sobre la supervivencia y reproducción de <i>L. udekemianus</i> , en microcosmos	<b>130</b>
3.4.2. Experiencia 6: Acumulación y eliminación de Cr por <i>L. udekemianus</i> , en mesocosmos	<b>132</b>

<b>3.5. Discusión</b>	<b>136</b>
<b>IV. CONCLUSIONES</b>	<b>142</b>
<b>V. ANEXO</b>	<b>146</b>
<b>VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>148</b>

La presente Tesis dio lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones a reuniones científicas:

**Publicaciones científicas en revistas indexadas:**

- Marchese, M.R.; A.R. Rodriguez; P. **Pavé** & M.R. Carignano. **2008**. Benthic invertebrates structure in wetlands of a tributary of the Middle Paraná River (Argentina) affected by hydrologic and anthropogenic disturbances. *J. Environ. Biol.* 29 (3): 343-348.
- Marchese, M.R.; A.M. Gagneten; M.J. Parma & **P. Pavé**. **2008**. Accumulation and elimination of chromium by freshwater species exposed to spiked sediments. *Arch. Env. Contam. Toxicol.* 55: 603-609.

**Presentaciones a reuniones científicas:**

- **Pavé, P.J.**; M.R. Marchese y Paporello, G. “Bioacumulación y eliminación de cromo por oligoquetos en mesocosmos”. XXII Reunión Argentina de Ecología, “Fronteras en Ecología: Hechos y Perspectivas”. Córdoba, Argentina. 2006.
- Marchese, M.; A.M. Gagneten; J. Parma y **P. Pavé**. “Acumulación y eliminación de cromo por organismos acuáticos a nivel de mesocosmos”. I Congreso SETAC Argentina. Los Cocos, Córdoba. Argentina. 2006.
- **Pavé, P.J.**; M.R. Marchese y M.A. Maine. “Toxicidad crónica del cromo en *Chironomus xanthus*.”. XV Congreso Argentino de Toxicología. ATA. Neuquén, Argentina. 2007.
- **Pavé, P.**; M.R. Marchese y M.A. Maine. “Toxicidad crónica del cobre en *Chironomus calligraphus*”. IV Congreso Argentino de Limnología”. Bariloche-Río Negro, Argentina. 2008.

- **Pavé, P.;** M.A. Maine y M.R. Marchese. “*Chironomus xanthus* (Diptera-Chironomidae) como biomonitor para determinar la toxicidad del Cu”. X Jornadas de Ciencias Naturales del Litoral y II Reunión Argentina de Ciencias Naturales. Santa Fe, Argentina. 2009.
- **Pavé, P.;** M.A. Maine y M.R. Marchese. “Efectos de metales sobre macroinvertebrados bentónicos”. Taller de bentos, ecología y sistemática. Santa Fe, Argentina. 2011.

## INDICE DE TABLAS

- Tabla 1.1:** Matriz de correlación (Spearman) para las variables físicas y químicas, en todas las estaciones de muestreo. Las referencias son las mismas que en la tabla anterior. \* Valores en negrita indican correlación significativa ( $p \leq 0,05$ ). **64**
- Tabla 1.2:** Rango de concentraciones de Cr y Cu total en agua ( $\text{mg l}^{-1}$ ), y en hepatopáncreas ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) de *P. canaliculata* en cada sitio de muestreo. S: humedal del río Salado, M: humedal del río Miní, C: humedal del río Coronda. **65**
- Tabla 1.3:** Test de LSD-Fisher resultante del ANOVA de dos vías a las densidades del bentos, por estaciones y años. **177**
- Tabla 1.4:** Composición taxonómica, abundancias y asignación de los grupos funcionales tróficos (GFT) del bentos registrados en cada estación y fecha de muestreo.\* indica:  $<99 \text{ ind.m}^{-2}$ , \*\* indica:  $100-999 \text{ ind.m}^{-2}$  y \*\*\* indica:  $>1000 \text{ ind.m}^{-2}$ . C: colectores, D: depredadores, F: filtradores y R: raspadores. Cód.: códigos. **70**
- Tabla 1.5:** Test de LSD-Fisher resultante del ANOVA de dos vías a las riquezas de especies del bentos, por estaciones y años. **177**
- Tabla 1.6:** Matriz de correlación (Spearman) para las variables físico-químicas y biológicas en todas las estaciones de muestreo. Las referencias son las mismas que en la Tabla 1.1 y Figura 1.31. \* Valores en negrita indican correlación significativa ( $p \leq 0.05$ ). **74**
- Tabla 1.7:** Promedio de los índices bióticos aplicados y Clasificación de calidad de agua (con esquema de colores) para ambas zonas (SJ y E). También se anexa la clasificación del índice de Shannon ( $H'$ ) según Wilhm y Dorris (1968). **81**

**Tabla 3.1:** Variables físicas y químicas (media  $\pm$  SD) medidas durante los 28 días de exposición. T1: 15,6 mg kg<sup>-1</sup> Cr, T2: 24,3 mg kg<sup>-1</sup> Cr. **130**

**Tabla 3.2:** Variables físicas y químicas (medias  $\pm$  SD) registradas en agua (excepto el AVS en sedimento) durante las fases de acumulación y eliminación, en todos los tratamientos (nd: no determinado). T1: 15,6 mg kg<sup>-1</sup> Cr, T2: 24,3 mg kg<sup>-1</sup> Cr. **132**

## INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1:** Ubicación del área de estudio. SJ: San Justo, E: Esperanza. **36**
- Figura 1.2:** Nivel hidrométrico (m) del río Salado de Norte durante el período estudiado. Las flechas indican los muestreos realizados. **36**
- Figura 1.3 a y b:** a) Ubicación de los humedales estudiados. S: río Salado, M: río Miní y C: río Coronda. b): Fotografías de una de las zonas de muestreo (C), y ejemplares de *P. canaliculata* (masas ovígeras y adultos). **39**
- Figura 1.4:** Valores de profundidad (m) en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), durante ambos períodos de muestreo. SJ1: San Justo, estación 1 en cauce principal. SJ2 y SJ3: San Justo, estaciones 2 y 3 de la llanura de inundación. E1: Esperanza, estación 1 en cauce principal. E2 y E3: Esperanza, estaciones 2 y 3 de la llanura de inundación. **42**
- Figura 1.5:** Valores de temperatura (°C) en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), durante ambos períodos de muestreo. **43**
- Figura 1.6:** Valores de transparencia (cm) en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), durante ambos períodos de muestreo. **44**
- Figura 1.7:** Valores de conductividad ( $\mu\text{Scm}^{-1}$ ) en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), durante ambos períodos de muestreo. **45**
- Figura 1.8:** Valores de pH en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), durante ambos períodos de muestreo. **46**
- Figura 1.9:** Valores de OD ( $\text{mg l}^{-1}$ ) en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), durante ambos períodos de muestreo. **47**
- Figura 1.10:** Valores de  $\text{DBO}_5$  ( $\text{mg l}^{-1}$ ) en las estaciones de la zona de referencia **48**

(SJ) y problema (E), durante ambos períodos de muestreo.

**Figura 1.11:** Valores de dureza ( $\text{mg l}^{-1} \text{CaCO}_3$ ) en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), durante ambos períodos de muestreo. **49**

**Figura 1.12:** Valores de alcalinidad ( $\text{mg l}^{-1} \text{CaCO}_3$ ) en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), durante ambos períodos de muestreo. **50**

**Figura 1.13:** Valores de amonio ( $\text{mg l}^{-1}$ ) en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), durante ambos períodos de muestreo. **51**

**Figura 1.14:** Valores de nitrato ( $\text{mg l}^{-1}$ ) en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), durante ambos períodos de muestreo. **52**

**Figura 1.15:** Valores de nitrito ( $\text{mg l}^{-1}$ ) en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), durante ambos períodos de muestreo. **53**

**Figura 1.16:** Valores de PT ( $\text{mg l}^{-1}$ ) en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), durante ambos períodos de muestreo. **54**

**Figura 1.17:** Valores de clorofila a ( $\text{mg.m}^{-3}$ ) en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), durante ambos períodos de muestreo. **54**

**Figura 1.18:** Composición granulométrica (% de arena, arcilla y limo), en cada estación de muestreo. **55**

**Figura 1.19:** Contenido de materia orgánica (%), en cada estación de muestreo. **56**

**Figura 1.20:** Concentraciones de Cr total en agua ( $\text{mg l}^{-1}$ ), en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), durante ambos períodos de muestreo. **57**

**Figura 1.21:** Concentraciones de Cu en agua ( $\text{mg l}^{-1}$ ), en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), durante ambos períodos de muestreo. **58**

**Figura 1.22:** Concentraciones de Pb en agua ( $\text{mg l}^{-1}$ ), en las estaciones de la zona **59**



de referencia (SJ) y problema (E), durante ambos períodos de muestreo.

**Figura 1.23:** Concentraciones de Cr total en sedimento ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), durante ambos períodos de muestreo. **60**

**Figura 1.24:** Concentraciones de Cu en sedimento ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), durante ambos períodos de muestreo. **61**

**Figura 1.25:** Concentraciones de Pb en sedimento ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), durante ambos períodos de muestreo. **62**

**Figura 1.26:** Ordenación de las estaciones de muestreo de acuerdo a las variables físico-químicas y químicas aplicando el Análisis de Componentes Principales (ACP). Prof: profundidad; OD: oxígeno disuelto; Cond: conductividad; T°C: temperatura; Dza: dureza; CrA: Cr total en agua; CuA: Cu en agua, PbA: Pb en agua; CrS, Cr total en sedimento; CuS: Cu en sedimento; PbS: Pb en sedimento; MO: materia orgánica. Ambos períodos se representan como: -05 (correspondiente a 2005) y -06 (correspondiente a 2006), los cuales se expresan también en las siguientes figuras. **63**

**Figura 1.27:** Densidad promedio (media  $\pm$  SD) de invertebrados bentónicos ( $\text{ind.m}^{-2}$ ) en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), durante ambos períodos de muestreo. **66**

**Figura 1.28:** Distancia euclidiana según las densidades de invertebrados bentónicos en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), durante ambos períodos de muestreo. **67**

**Figura 1.29:** Porcentajes de las abundancias relativas de los grupos de invertebrados bentónicos representativos por cada estación y fecha de muestreo. **68**

- Figura 1.30:** Riqueza (RE) y Diversidad (H) específica de invertebrados bentónicos en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), durante ambos períodos de muestreo. **72**
- Figura 1.31:** Ordenación de las estaciones de muestreo de acuerdo a la densidad de los taxa y atributos bentónicos aplicando el Análisis de Correspondencia Detendenciado (DCA). Los códigos están expresados en la tabla 1.4, a excepción de la DT: densidad total y RE: riqueza específica. **73**
- Figura 1.32:** Porcentajes de las abundancias relativas de los grupos funcionales tróficos (GFT) de invertebrados bentónicos representativos por cada estación y fecha de muestreo. **76**
- Figura 1.33:** Promedio del índice Iberic Biological Monitoring Working Party (IBMWP), obtenido según los invertebrados bentónicos, en cada estación de muestreo. **77**
- Figura 1.34:** Promedio del Índice de Macroinvertebrados para Ríos Pampeanos (IMRP), obtenido según los invertebrados bentónicos, en cada estación. **78**
- Figura 1.35:** Promedio del Índice Average Score Per Taxón (ASPT), obtenido según los invertebrados bentónicos, en cada estación. **79**
- Figura 1.36:** Promedio de la relación densidad de oligoquetos/densidad total (DT), obtenido según los invertebrados bentónicos, en cada estación. **80**
- Figura 1.37:** Promedio de la relación densidad de quironómidos/densidad total (DT), obtenido según los invertebrados bentónicos, en cada estación. **80**
- Figura 2.1:** Cultivo de las masas ovígeras de *C. gr. decorus* y detalle de dos masas ovígeras bajo lupa. **97**

- Figura 2.2:** Incubadora usada en la experiencia, con los diferentes tratamientos- recipientes estudiados. También se muestra una larva de *C. gr. decorus* y su cápsula cefálica normal, bajo microscopio. **100**
- Figura 2.3:** Incubadora con los tratamientos-recipientes. Se muestra además, la separación de los organismos del sedimento y larvas depurando sus intestinos. **102**
- Figura 2.4:** Porcentaje (media  $\pm$  SD) de malformaciones bucales en las larvas, luego de 10 días de exposición, en todos los tratamientos. T1:0,50 mg l<sup>-1</sup> Cu, T2:0,75 mg l<sup>-1</sup> Cu, T3:1,00 mg l<sup>-1</sup> Cu, T4:1,25 mg l<sup>-1</sup> Cu. **105**
- Figura 2.5:** Cápsulas cefálicas de larvas con mentón y mandíbulas normales (arriba) y con mentones malformados, en el diente medio trífido (abajo). **105**
- Figura 2.6:** Largo ventromental (mm) de las cápsulas cefálicas larvales (media  $\pm$  SD), luego de los 10 días de exposición en todos los tratamientos. **106**
- Figura 2.7:** Porcentaje de las larvas que alcanzaron el 4º estadio, luego de 10 días de exposición, en todos los tratamientos. **106**
- Figura 2.8:** Concentración del Cu (media  $\pm$  SD) en agua, sedimentos de fondo y tejidos larvales en todos los tratamientos. **107**
- Figura 2.9:** Porcentaje de emergidos durante la experiencia, en todos los tratamientos. T1:0,50 mg l<sup>-1</sup> Cu, T2:0,75 mg l<sup>-1</sup> Cu, T3:1,00 mg l<sup>-1</sup> Cu, T4:1,25 mg l<sup>-1</sup> Cu. **109**
- Figura 2.10:** Número de adultos emergidos durante la experiencia en todos los tratamientos. Control *versus* T1 y T2 (arriba). Control *versus* T3 y T4 (abajo). **109**

- Figura 2.11:** Porcentaje de emergidos durante la experiencia, en todos los 111  
tratamientos. T1:0,50 mg l<sup>-1</sup> Cr, T2:0,75 mg l<sup>-1</sup> Cr, T3:1,00 mg l<sup>-1</sup> Cr, T4:1,25 mg l<sup>-1</sup>  
Cr.
- Figura 2.12:** Número de adultos emergidos durante la experiencia en todos los 111  
tratamientos. Control *versus* T1, T2 y T3 (arriba). Control *versus* T4 (abajo).
- Figura 3.1:** Tanques experimentales (tratamientos) del mesocosmos. 126
- Figura 3.2:** Porcentaje de supervivencia de *L. udekemianus* por tratamiento durante 131  
los 28 días de exposición.
- Figura 3.3:** Número de adultos y juveniles (media ± SD) de *L. udekemianus* por 131  
tratamiento, durante los 28 días de exposición.
- Figura 3.4:** Concentración de Cr total durante las fases de acumulación y 133  
eliminación, en columna de agua (mg l<sup>-1</sup>), sedimento (mg kg<sup>-1</sup>, peso seco) y tejido  
de oligoquetos (mg kg<sup>-1</sup>, peso seco), en todos los tratamientos.
- Figura 3.5:** Factor de Bioconcentración (FBC) y Factor de Bioacumulación (FBAs) 134  
en *L. udekemianus* para ambas concentraciones estudiadas, durante la fase de  
acumulación.
- Figura 3.6:** Tasas de acumulación del Cr en *L. udekemianus*, en ambas 135  
concentraciones estudiadas (mg kg<sup>-1</sup>, peso seco por día).

## I. RESUMEN

Los metales representan contaminantes de alto impacto en los sistemas acuáticos debido a que no son biodegradables sino que persisten en el sistema. Son acumulados en los sedimentos de fondo y de esta manera pueden resultar tóxicos para la biota residente, con la posibilidad además de ser bioacumulables a través de las tramas tróficas.

La cuenca del río Salado del Norte, en su tramo inferior (provincia de Santa Fe), es receptora de diversos contaminantes como resultado directo o indirecto de las actividades humanas que se desarrollan en la zona. Entre los contaminantes se encuentran los metales pesados, que son vertidos al río por efluentes provenientes principalmente de curtiembres e industrias manufactureras del cuero, las cuales emplean sales de cromo como agente curtiente, o efluentes provenientes de galvanoplastias, talleres mecánicos, naftas, residuos domésticos y agrícolas que contienen Cu, Cr y Pb.

Por lo expuesto, ante tal situación registrada en dicha cuenca, surge la necesidad de desarrollar nuevos estudios que permitan diagnosticar el estado de salud de la cuenca, para lo cual se plantearon los principales objetivos generales en esta tesis: (1) Evaluar el grado de perturbación que presenta el río Salado del Norte, determinando cómo la contaminación por metales afecta el ensamble de invertebrados bentónicos y establecer qué especies actúan como mejores indicadores de la salud ambiental. (2) Complementar el estudio de campo con bioensayos para evaluar los efectos de metales (Cr y Cu), sobre distintos puntos finales en macroinvertebrados bentónicos: *Chironomus* gr. *decorus* (Diptera, Chironomidae) y *Limnodrilus udekemianus* (Oligochaeta, Naididae).

Para el primer objetivo, se realizaron dos muestreos, uno en el período de aguas altas y otro en aguas bajas. Se analizaron dos zonas, una considerada como referencia (San Justo: SJ) y otra considerada como problema (Esperanza: E), tanto en el centro del cauce principal (estación 1), como en su llanura de inundación (estaciones 2 y 3). La caracterización de cada zona se realizó a través de la medición de los parámetros físicos y químicos, de las concentraciones de metales pesados (Cr, Cu y Pb) en agua y sedimentos de fondo y del análisis de la comunidad de macroinvertebrados bentónicos. Además se analizaron en humedales del mismo río y en otros alrededores, las concentraciones de metales más abundantes (Cr y Cu) en hepatopáncreas de *Pomacea canaliculata* (Mollusca, Gastropoda) y en agua, con el fin de evaluar la capacidad de acumulación por parte de

dicha especie. Los atributos analizados del bentos fueron: densidad total y relativa; riqueza específica, equitatividad y diversidad específica; diversidad alfa, beta y gama; análisis de grupos funcionales tróficos e índices bióticos (IBMWP, ASPT e IMRP). Se calcularon además las relaciones: densidad de oligoquetos/densidad total, densidad de quironómidos/densidad total.

En cuanto al segundo objetivo, se eligieron para los bioensayos a *C. gr. decorus* y *L. udekemianus* por ser taxa claves en los ensamble de macroinvertebrados bentónicos de los ambientes analizados y por ser reconocidos mundialmente como organismos test para ser utilizados en estudios con sedimentos contaminados. En *C. gr. decorus* se evaluó la capacidad de acumulación del Cu en sus tejidos y por otro lado, las posibles malformaciones en las cápsulas cefálicas y alteraciones del ciclo de vida (sobre el desarrollo larval y emergencia) producidas por el Cu y Cr, en experiencias a escala de microcosmos. En *L. udekemianus* se evaluó el efecto del Cr sobre la reproducción (también a escala de microcosmos), y se determinó además la capacidad de acumulación y eliminación del Cr por esta especie, a escala de mesocosmos.

Los resultados del estudio en el río Salado revelaron que tanto SJ como E presentan altas concentraciones de metales pesados (Cr, Cu y Pb) y junto a las variables físicas y químicas analizadas en agua y sedimentos de fondo, diferenciaron claramente el estado de calidad del agua entre el cauce principal y los ambientes de la llanura de inundación de ambas zonas. Por lo tanto, SJ no constituyó una adecuada zona de referencia. Las concentraciones de metales en agua en todas las estaciones analizadas, fueron mayores a los estándares permitidos. Si bien las concentraciones de metales en sedimentos de fondo fueron altas, no superaron los estándares comparados.

En cuanto al análisis de los macroinvertebrados bentónicos, los valores mayores de densidad, riqueza y diversidad específica correspondieron en general a las estaciones de la llanura de inundación de ambas zonas, siendo la densidad, el atributo que permitió la principal diferenciación entre ellas, con mayores valores en SJ. Sin embargo, la mayor densidad en SJ, no se debió a una mejor calidad del agua, sino a la dominancia de nemátodos. Por lo tanto, dichos atributos no son parámetros representativos en los tramos estudiados del sistema del río Salado del Norte para determinar el grado de contaminación por metales. Se determinaron los ensambles de los macroinvertebrados bentónicos para

cada zona, presentando mayor simplificación en E, y en el cauce del río de ambas zonas, en relación a los ambientes de la llanura. Así los taxa dominantes en la llanura de inundación de **SJ**, fueron: Mermithidae I, *C. gr. decorus*, Ceratopogonidae, *Coelotanypus* sp., *Limnodilus hoffmeisteri*, Planorbidae I, *Dero (Dero) multibranchiata*, *D. (Aulophorus) furcatus* y *D. (A.) vagus*. En el cauce principal de SJ, el ensamble estuvo formado por Ostracoda I, Mermithidae I, *D. (D.) nivea* y Sphaeriidae. Por otra parte, en la llanura de inundación de **E** los taxa dominantes fueron: *Bothrioneurum americanum*, Mermithidae I, Ephydriidae I, Ostracoda I, *D. (D.) nivea*, Hirudinae I y *Campsurus* sp. En el cauce principal de **E** los dominantes fueron, Mermithidae I y *C. gr. decorus*.

Del análisis de grupos funcionales tróficos e índices bióticos, solo la relación densidad de oligoquetos *versus* densidad total, y densidad de quironómidos *versus* densidad total, permitió diferenciar a SJ de E. Dichos resultados demostraron que, E tendría peor calidad del agua debido, principalmente, por los oligoquetos.

Los moluscos gasterópodos, pueden acumular concentraciones de metales en sus tejidos en proporciones superiores al medio acuático. Hasta el presente, no existe información al respecto en los ambientes estudiados, por lo que resultó de relevante interés el estudio realizado en *P. canaliculata*. Los resultados demostraron que dicha especie respondió como buen acumulador de estos metales, indicando su utilidad en biomonitoreos de contaminación por Cr y Cu.

En las experiencias en laboratorio con *C. gr. decorus*, se encontró que concentraciones  $\geq 0,75 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}$ , afectó el desarrollo larval, la emergencia y produjo malformaciones en las cápsulas cefálicas. Estas últimas pueden ser consideradas como un buen indicador de contaminación para biomonitoreos. Mientras que *C. gr. decorus* no fue un buen acumulador de Cu en sedimentos contaminados, pero sí lo fue en el medio acuoso, de acuerdo a los resultados obtenidos. En relación al Cr, por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en el número de emergidos entre todos los tratamientos (inclusive el control), ni tampoco se registraron malformaciones en las cápsulas cefálicas. Sin embargo la supervivencia larval fue afectada a diferencia de las experiencias llevadas a cabo con Cu.

En relación a los bioensayos con *L. udekemianus* y Cr, este estudio proporcionó evidencias de que dicha especie es afectada por el Cr, ya que afectó la reproducción. *L.*

*udekemianus* tiene la capacidad de acumular el metal, según las concentraciones testeadas, lo que permite considerarlo también (al igual que *P. canaliculata*) como un buen bioacumulador en ambientes contaminados por Cr.

Los resultados obtenidos en esta tesis, permitieron reflejar la contaminación que presenta la cuenca del río Salado del Norte en los tramos estudiados, como consecuencia de las actividades antrópicas desarrolladas en ella, principalmente debido a las actividades industriales mediante el vertido de efluentes con altas cargas de metales pesados.



## II. ABSTRACT

Heavy metals are pollutants that can affect the biota of the freshwater environments due to its persistence in the environments. They are accumulated in bottom sediments and thus can be toxic to resident biota, with the potential from being bioaccumulated through food webs.

The Salado del Norte River Basin in its lower section (Santa Fe Province) is recipient of different pollutants such as direct or indirect results of human activities developed in the region. Among the contaminants are heavy metals that are discharged into the river by effluents from industries, such as tanneries, production of steel, pigment manufacturing, plating, wood preservation, combustion of coal and oil, leather tanning, domestic and farmer wastes that include Cu, Cr and Pb.

For these reasons, studies to evaluate the water quality were carried out with the following objectives: (1) To evaluate the perturbation degree of Salado del Norte River, determining how the heavy metal contamination affects the benthic invertebrate assemblages and establish which species are best indicators of environmental health. (2) To evaluate in experimental conditions, the effects of metals (Cr and Cu) on different end points in benthic macroinvertebrates: *Chironomus gr. decorus* (Diptera, Chironomidae) and *Limnodrilus udekemianus* (Oligochaeta, Naididae).

For the first objective, two samplings were carried out, one in high water level period and another in low water level. Two areas were analyzed, one considered as reference (San Justo, SJ) and the other considered as disturbed area (Esperanza, E), including the central strip in the main channel (site 1) and in its floodplain (sites 2 and 3). The characterization of each area was performed determining physical and chemical variables, metal concentrations (Cr, Cu and Pb) in water and bottom sediments and by the benthic macroinvertebrates assemblages. Wetlands associated to the river were also analyzed, concentrations of the most abundant metals (Cr and Cu) in the pancreas of *Pomacea canaliculata* (Mollusca, Gastropoda) and in water were determined with the aim to evaluate its accumulation capacity. The benthic attributes analyzed were: total and relative density, taxa richness, evenness, species diversity, alpha, beta and gamma diversity, functional trophic groups and biotic indexes (IBMWP, ASPT and IMRP). The oligochaeta density/ total density and chironomids density/ total density relations were calculated.

In relation to the second objective, *C. gr. decorus* and *L. udekemianus* were selected as species to be used in bioassays, owing they are key taxa in the benthic macroinvertebrates assemblages in the environments studied and they are worldwide accepted as organisms test in contaminated sediments. The Cr accumulation capacity of *C. gr. decorus* was evaluated and the possible deformities in the head capsules and life cycle alterations (larval developments and emergence) produced by Cu and Cr concentrations in experiences at microcosms scale, were analyzed. The effect of Cr on the reproduction of *L. udekemianus* (at microcosms scale) was analyzed and also the Cr accumulation and elimination capacity at mesocosmos scale was determined.

The results obtained in the Salado river study revealed that both, SJ and E show high metals concentrations (Cr, Cu and Pb). Physical and chemical variables analyzed in water and bottom sediments clearly differentiated the water quality among the main channel and the environments of the floodplain in both areas. Therefore, SJ was not a suitable reference area. The metals concentrations in water of the environments studied were higher than the standards allowed. On the other hand, the metals concentrations in bottom sediments did not overcome the standards.

In the analysis of benthic macroinvertebrates, larger values of density, richness and species diversity generally corresponded to the stations of the flood plain of both areas. The density was the attribute more significant in the differentiation of both areas, with more values in SJ. However the highest density was reached by nematodes. Thus, these attributes are not representative in the Salado river system for determining the contamination degree by metals. The macroinvertebrates assemblages for each area were established showing greater simplification in E and in the main channel of both areas than in the floodplain sites. The taxa dominant in the SJ floodplain were Mermithidae I, *C. gr. decorus*, Ceratopogonidae, *Coelotanypus* sp., *Limnodilus hoffmeisteri*, Planorbidae I, *Dero (Dero) multibranchiata*, *D. (Aulophorus) furcatus* and *D. (A.) vagus*. In the main channel of SJ, the assemblage was formed by Ostracoda I, Mermithidae I, *D. (D.) nivea* and Sphaeriidae. On the other hand, in the E floodplain, the taxa dominant were *Bothrioneurum americanum*, Mermithidae I, Ephydriidae I, Ostracoda I, *D. (D.) nivea*, Hirudinae I and *Campsurus* sp. In the main channel of E, were Mermithidae I and *C. gr. decorus*.

The relations oligochaeta density *versus* total density and the chironomids density *versus* total density showed differences between SJ and E. These results demonstrated that E has worse water quality than SJ, mainly by the oligochaetes.

The mollusks can accumulate metal concentrations in their tissue in higher proportions than the aquatic environments. The results obtained showed that *P. canaliculata* responded as a good bioaccumulator of metals, indicating its use as biomonitor of contamination by Cr and Cu.

In the laboratory experiments with *C. gr. decorus*, was found that concentrations  $\geq 0,75 \text{ mg l}^{-1}$  Cu, affected the larval development, the emergence and produced head capsules deformities. These deformities may be considered as good indicator of contamination for biomonitoring. While *C. gr. decorus* was not a good bioaccumulator of Cu in contaminated sediments, but it was a good one in water. In relation to Cr, there were not significative differences in the number of adults emerged among the treatments (include the control), neither in head capsules deformities. However, the larval survival was affected in contrast to the experiments carried out with Cu.

In relation to bioassays using *L. udekemianus* exposed to Cr, this study provided evidence that this species is affected the reproduction. *L. udekemianus* has the capacity of accumulate the metal, and then it can be considered, like *P. canaliculat*, as a good bioaccumulator in environments contaminated by Cr.

The results obtained in this thesis allow us to know the contamination that presents the Salado del Norte river basin in the sections studied, as consequence of human activities developed in it, mainly due to industrial activities by the discharge of effluents with high concentrations of heavy metals.

### III. Introducción General

---

### **III-INTRODUCCIÓN GENERAL**

#### **III.I. Estado actual del conocimiento del tema**

El estudio de la contaminación de los cuerpos de agua continentales mediante la biota es una práctica bien establecida desde hace muchos años (Hynes, 1960). Al comienzo, los análisis químicos eran los métodos utilizados para evaluar la calidad de las aguas, aunque no resultaban eficientes cuando se producían contaminaciones no puntuales de origen difuso. De esta manera, tempranamente en el Hemisferio Norte (siendo en Europa los primeros estudios), surgen los monitoreos biológicos que utilizaban métodos microbiológicos para detectar contaminación fecal y otros tipos de contaminación orgánica (resumidos en Hynes, 1960), complementando así los análisis químicos para el diagnóstico de la contaminación.

Posteriormente los estudios se fueron ampliando en respuesta a la demanda por las perturbaciones en los sistemas acuáticos producto de la actividad y expansión agrícola e industrial. Ante esta situación, surgen nuevas investigaciones que incluían métodos biológicos con diferentes organismos y se incrementa, además, el conocimiento sobre los niveles de metales pesados, derivados de la extensa actividad industrial. De esta manera, las presiones creadas por las actividades humanas sobre los recursos acuáticos, estimularon a los científicos a desarrollar nuevas herramientas de biomonitoreo para poder detectar los problemas asociados al deterioro ecológico, convirtiéndose en una herramienta valiosa y complementaria a los métodos químicos (Segnini, 2003).

El biomonitoreo de las aguas continentales, es el estudio de los organismos y su capacidad de responder a los efectos de perturbaciones eventuales o permanentes de las condiciones ambientales en que viven. Otro concepto que surge con el avance de estas metodologías es el de bioindicador, el cual se refiere al estudio de las especies o grupos de especies que pueden ser usados para evaluar las condiciones ambientales (Rosenberg y Resh, 1993). Es conocido que la biota acuática cambia su estructura (Por ej., composición de especies y abundancia relativa) y/o funcionamiento al modificarse las condiciones ambientales en las que vive, permitiendo evaluar y reflejar el estado de salud del cuerpo de agua. Dichas características permitió el concepto de indicador ecológico, describiéndose como las mediciones para evaluar fácil y rápidamente la

composición, estructura y función de los complejos sistemas ecológicos. El papel principal de los indicadores ecológicos es dar herramientas para evaluar las respuestas del ecosistema a perturbaciones antropogénicas (Niemi y Mc Donald, 2004).

Los índices de diversidad marcan en la década del 60 una nueva etapa en el uso de los macroinvertebrados bentónicos como bioindicadores. Sin embargo, si bien son muy utilizados mundialmente, presentan desventajas tales como el problema del nivel de determinación taxonómica. Además fueron perdiendo peso por el debilitamiento de las hipótesis que pretendían establecer una relación causa-efecto entre diversidad y estabilidad de los ecosistemas (Washington, 1984).

Los índices bióticos sustituyen progresivamente a las medidas de diversidad. En ellos además de cuantificar la presencia o ausencia de un taxón y/o su abundancia, se pondera de acuerdo a la sensibilidad que presenta al factor de perturbación que se quiere valorar (Segnini, 2003, Prat *et al.*, 2009). Ellos son muy usados en todo el mundo y adaptados en las diferentes regiones (como en los países del Hemisferio Sur) para monitorear las condiciones biológicas de los sistemas acuáticos. La primera clasificación fue el sistema de los Saprobios (Kolkwitz y Marsson, 1902) y el de eutrofización (Thienemann, 1925). Otros índices que surgieron posteriormente por ejemplo son: Trent Biotic Index (IBT, Woodiwiss, 1964), Biological Monitoring Working Party (BMWP, Hellowell, 1978), Average Score Per Taxon (ASPT, Armitage *et al.*, 1983), Iberian BMWP (IBMWP, Alba-Tercedor y Sanchez-Ortega, 1988), Iberian ASPT (IASPT, Alba-Tercedor *et al.*, 2004), Índice Biótico de Familia (IBF, Hilsenhoff, 1988), Índice Biológico PAMPeano (IBPAMP, Rodrigues Capítulo *et al.*, 2001), etc. La mayoría están basados en invertebrados bentónicos (aunque también se han elaborado con diatomeas o macrófitas), y fueron diseñados y usados en un principio para contaminación orgánica, pero actualmente se los utiliza para problemas de contaminación en general ya que en la mayoría de los ambientes se registra tanto la contaminación orgánica como la inorgánica.

El desarrollo de la estadística y el eficaz uso de las computadoras, permitió a partir de 1980 el desarrollo de nuevas herramientas para las evaluaciones biológicas, como son los análisis multivariados [como Principal Components Analysis (PCA), Correspondence Analysis (CA), Canonical Correspondence Analysis (CCA), etc.].

Estos son ampliamente utilizados para determinar patrones de estructura de ensamblajes, infiriendo relaciones especies-ambiente y analizando impactos humanos sobre ecosistemas (Cao *et al.*, 2002).

También son ejemplo de nuevas herramientas para el estudio de ambientes lóticos, los métodos multimétricos y los predictivos. Ambos tienen la característica de comparar sitios impactados con sitios de referencias poco perturbados. La diferencia fundamental entre ellos radica en la manera de medir la “integridad biótica”, que es un término que reorienta el concepto de la bioindicación. Entre los primeros se determina, midiendo diversos atributos (riqueza de especies, diversidad, dominancia, densidad, grupos funcionales tróficos, etc.), que se reúnen en una puntuación final, la cual es comparada con la del sitio de referencia o condición biológica “óptima” (=integridad biológica). Mientras que en los modelos predictivos, dicha integridad biológica está definida en relación a la composición de la biota, es decir en la diferencia que existe en la composición de taxa entre los sitios impactados y los de referencia, siempre y cuando ambos grupos de sitios tengan condiciones fisicoquímicas similares (Norris y Hawkins, 2000). Métodos multimétricos fueron desarrollados principalmente en el Hemisferio Norte, siendo por ejemplo los utilizados por Plafkin *et al.* (1989), Kerans y Karr (1994), Barbour *et al.* (1999) y Buffagni *et al.* (2006). A partir de muchos de ellos, se han creado protocolos como el implementado por la Environmental Protection Agency (Gibson *et al.*, 1996; Barbour *et al.*, 1999). En nuestro hemisferio, Moya *et al.* (2007) en Bolivia y Batptista *et al.* (2007) en Brasil desarrollaron índices multimétricos, mediante diferentes métricas usadas para evaluar la calidad biológica de ríos. Por otra parte, métodos predictivos podemos mencionar al RIVPACS (River InVertebrates Prediction and Classification System, Wright *et al.*, 1993), o su equivalente en Australia, el AUSRIVAS (AUStralian RIVer Assessment Scheme, Smith *et al.*, 1999; Simpson y Norris, 2000).

Las medidas funcionales tales como los Grupos Funcionales Tróficos (GFT) y la determinación de rasgos biológicos son otras herramientas eficaces a la hora de determinar la calidad de salud de un sistema acuático. El ciclo de la materia orgánica y el flujo de energía son procesos básicos asociados con la integridad funcional de los ecosistemas lóticos (Vannote *et al.*, 1980), por lo tanto los macroinvertebrados bentónicos suelen ser asignados en los GFT de acuerdo a sus mecanismos de

alimentación, fuentes de energía y tamaño del alimento (Cummins, 1973). Así las evaluaciones de estos grupos son basadas en sus abundancias relativas o absolutas, relaciones entre ellas, etc. En muchos estudios han sido ampliamente utilizados en biomonitoreos de calidad de agua por diferentes tipos de perturbaciones (resumidos en Dolédec y Statzner, 2010).

La comunidad biológica más frecuentemente utilizada para evaluar la calidad de aguas en ríos del mundo es la de macroinvertebrados bentónicos. Esto se refleja en la extensa literatura que hay sobre la ecología de varias especies de esta comunidad y en estudios de contaminación, sobre todo desde que la Agencia de protección ambiental de USA (1973) recomendó su uso como indicadores de calidad del agua. En Prat *et al.* (2009) y Dolédec y Statzner (2010), se resumen estudios en todo el mundo sobre ensambles de macroinvertebrados bentónicos desde sus comienzos a la actualidad. Ellos son una colección heterogénea de taxa diversos y por lo tanto al menos algunos reaccionarán a cambios específicos de calidad del agua (De Pauw y Hawkes, 1993). Ellos son utilizados en diversos tipos de estudios, tanto en campo (ej.: donde se evalúan repuestas a diferentes tóxicos, mediante el análisis de la estructura y funcionamiento de poblaciones o comunidades), como en laboratorio, mediante técnicas de bioensayos, con el fin de evaluar los efectos de los contaminantes químicos sobre diferentes aspectos de los organismos (ciclos de vida, comportamiento, etc.).

El uso de los macroinvertebrados bentónicos presenta una serie de ventajas que hacen que sean los bioindicadores elegidos mundialmente para estudios de calidad de agua (Rosenberg y Resh, 1993; Resh, 2008). Entre ellas podemos citar: 1) Tienen amplia distribución, representados en distintos lugares y ambientes. 2) Ser en su mayoría sedentarios, en contraposición a los taxa del fito y zooplancton (que además tienen ciclos de vida muy cortos) y a los peces (que poseen elevada movilidad y de esta manera la posibilidad de huir de las fuentes puntuales de contaminantes), permitiendo el análisis espacial de los contaminantes. 3) Los ciclos de vida de muchas especies son lo suficientemente largos para determinar el efecto crónico, así como lo suficientemente cortos como para observar los cambios en la estructura de la comunidad en un período razonable de estaciones o años. 4) Presentan una gran riqueza de especies y por lo tanto una gran diversidad de respuestas a las condiciones ambientales (tanto de contaminantes en el agua como en el sedimento). 5) Viven y se alimentan en o sobre el sedimento,



donde tienden a acumularse los contaminantes, los cuales pueden ser incorporados a las tramas tróficas a través de ellos. Así los organismos bentónicos, como resultado de su directa asociación con el sedimento de fondo, pueden actuar como depositarios y conductores de contaminantes, por interacción física, química y biológica con dichos sedimentos, actuando como continuos monitores de calidad del agua que fluye sobre ellos. 6) Participan activamente en la purificación de los ríos, procesando materia orgánica de origen natural o antropogénica y en el ciclo de nutrientes. 7) La taxonomía en general es bien conocida a nivel de familia, género y, en algunos taxa, hasta especies o morfoespecies. 8) Existe abundante información sobre la sensibilidad de muchos taxa a los diferentes contaminantes. 9) Pueden ser muestreados de manera sencilla y económica.

De esta manera, un gran número de metodologías han sido desarrolladas para detectar los efectos de compuestos tóxicos sobre distintos niveles de organización biológica/ecológica. Tales protocolos incluyen medidas a campo y laboratorio, de cambios de parámetros que operan en la estructura de la comunidad (reducción de la diversidad, dominancia de especies oportunistas, reducción en el tamaño medio de las especies dominantes, sucesión de especies, etc.), o funcionales, que operan sobre procesos del ecosistema (producción primaria y secundaria, descomposición, ciclo de nutrientes, grupos funcionales, etc.) (Schindler, 1987; Gray, 1989; Pratt y Cairns, 1996). Aún en la actualidad, no hay consenso si los efectos estructurales o funcionales son los puntos finales más apropiados en estudios ecotoxicológicos. La evaluación de compuestos tóxicos liberados a ambientes acuáticos ha sido en mayor medida basada en resultados extrapolados de ensayos monoespecíficos utilizando algas, cladóceros, oligoquetos y peces, entre otros organismos. Los valores así derivados han sido considerados como insuficientes para describir los efectos sobre ecosistemas comparados con los resultados obtenidos de comunidades naturales o ensayos de sistemas completos (Ravera, 1989). Los tests multiespecíficos o modelos de ecosistemas han sido desarrollados para proveer una mejor comprensión de los efectos de los tóxicos sobre respuestas estructurales y funcionales de sistemas complejos. Las medidas estructurales son probablemente más sensibles al estrés natural o antropogénico que las medidas funcionales, debido a la redundancia en ecosistemas naturales (Van Leeuwen, 1996). Así, cambios estructurales detectados durante el estrés

ocasionado por polución, ocurrirían antes que los funcionales y esto sugiere que mecanismos de regulación a nivel de población, comunidad y ecosistema tienden a preservar las funciones mientras están ocurriendo los cambios estructurales (Schindler, 1987; Gray, 1989). Otra discusión, está en relación a la extinción de especies sensibles y a la habilidad de los ecosistemas a mantener su función. Es importante conocer si la pérdida de biodiversidad perjudica el funcionamiento de un ecosistema (Tilman *et al.*, 1997). La variedad de funciones que ciertas especies pueden cumplir es limitada y por lo tanto, intuitivamente, parece razonable que el incremento de especies, aumente la diversidad funcional resultando de ello un mejor funcionamiento (estabilidad, incremento de producción, retención de nutrientes, etc.), del ecosistema. Sin embargo, este tópico es aún controvertido, habiendo diferentes hipótesis referidas a cómo los ecosistemas pueden responder a la disminución de especies (Jones y Lawton, 1995; Tilman, *et al.*, 1997; Hooper y Vitousek, 1997; Cardinale *et al.*, 2009; Naeem *et al.*, 2009; entre otros). No obstante, cuando las condiciones ambientales cambian, las especies más tolerantes pueden mantener los procesos del ecosistema, pero las especies más sensibles desaparecen. Esto es de particular importancia desde que las acciones humanas se han incrementado e intensificado produciendo transformaciones en los sistemas. Por lo tanto, es fundamental conocer cómo la biodiversidad y el funcionamiento de los ecosistemas son afectados por perturbaciones ambientales naturales y antropogénicas.

### **III.II. Criterios seguidos para la evaluación de los efectos de metales a distintos niveles de organización**

Para el desarrollo de esta tesis se tomó como base al criterio establecido por Chapman *et al.* (1992), quienes proponen distintas categorías de métodos para evaluar las diferentes respuestas de los macroinvertebrados bentónicos a utilizarse en la caracterización de la calidad de un ambiente, tales como:

- 1) Análisis de la concentración de tóxicos en tejidos
- 2) Estudios de toxicidad crónica
- 3) Estructura de la comunidad
- 4) Estructura de grupos funcionales de la comunidad

Con esta información, se pretendió hacer un análisis integrado de las diferentes respuestas del bentos a la contaminación por metales, con el fin de poder acercarnos a una determinación más precisa del estado de calidad del río Salado del Norte.

En cuanto al ítem 1) Análisis de la concentración de los tóxicos en tejidos, se midió en campo la concentración de metales en *Pomacea canaliculata* (Mollusca, Gastropoda) en diferentes humedales, y en laboratorio se determinó la capacidad de acumulación de metales en *Limnodrilus udekemianus* (Annelida, Oligochaeta) y en *Chironomus* grupo *decorus* (Diptera, Chironomidae).

Para el ítem 2) Estudios de toxicidad crónica, se investigaron diferentes respuestas a nivel de organismos (y población), en cuanto a los efectos de metales sobre: supervivencia, reproducción, ciclos de vida (emergencia, en el caso de los insectos) y malformaciones en cápsulas cefálicas, utilizando *L. udekemianus* y *C.* grupo *decorus*.

En cuanto al ítem 3) Estructura de la comunidad (incluyendo cauce principal y humedales asociados), se midieron los principales atributos tales como: densidad, riqueza de especies, diversidad específica, índices de distancia e índices bióticos.

En relación al ítem 4) Estructura de grupos funcionales, se analizó la composición de los grupos funcionales tróficos en todos los ambientes analizados para el ítem 3.

Los contaminantes acumulados en los sedimentos acuáticos pueden ingresar en los tejidos y órganos de los organismos bentónicos por vía directa desde el medio acuático, por ejemplo en branquias, tegumento, etc. o por ingestión de partículas (bioconcentración o bioacumulación), así como a través de las tramas tróficas siguiendo varias vías a lo largo de diferentes niveles tróficos (biomagnificación). Estos procesos no siempre se manifiestan en efectos adversos como la mortalidad, sino que pueden ocurrir fenómenos complejos, tales como alteraciones en las tasas de crecimiento, reproducción y demás cambios en los ciclos de vida de los organismos. También muchos efectos de los tóxicos se manifiestan en cambios a nivel morfológico o histológico (ej., malformaciones). Un cambio cuantificable ya sea a nivel bioquímico, fisiológico, morfológico o histológico que se manifiesta ante la exposición de un organismo a uno o más contaminantes químicos (o físicos) se los denomina

“biomarcador”. De esta manera, los biomarcadores son considerados respuestas tempranas a la contaminación, ya que actúan como señal de alarma para la evaluación del estado de salud de las comunidades biológicas (Van Gestel y Van Brummelen, 1996; Walter *et al.*, 2001).

Los criterios que deberían tenerse en cuenta antes que una especie sea adoptada como rutina en estudios con sedimentos acuáticos contaminados son: a) disponibilidad durante todo el año, b) adecuada abundancia y cantidad de biomasa, c) fácil manipulación y cultivo en laboratorio, d) tolerancia a un amplio rango de características físicas y químicas de los sedimentos, e) baja sensibilidad a los tóxicos asociados con el sedimento, f) especies con una importancia ecológica, comercial o de recreación y g) tolerancia a período largo de tiempo de exposición sin agregar alimento (US EPA, 2000).

Los contaminantes, de esta manera, una vez incorporados por los macroinvertebrados bentónicos pueden acceder a toda la trama trófica de un ecosistema, afectando no solamente la biota en contacto directo con el sedimento, sino también peces, anfibios, aves y mamíferos, incluyendo seres humanos (por consumo de organismos contaminados), por lo que constituye un serio riesgo potencial para el ecosistema (Franke, *et al.*, 1994). Los ambientes así contaminados, tienen también implicancias de tipo económico, ya que afecta la pesca, la recreación y el turismo.

### **III.III. Características y antecedentes sobre el área de estudio**

La explotación agrícola ganadera y la actividad industrial se han incrementado considerablemente en los últimos años en la región centro-este de nuestro país. Esta región incluye una extensa red hidrográfica representada por la planicie de inundación del río Paraná y sus dos tributarios principales, los ríos Salado del Norte y Carcarañá, los que presentan distintos problemas de contaminación.

La cuenca del río Salado del Norte, en su tramo inferior (provincia de Santa Fe), es una de las más contaminadas de Argentina. En ella se han producido situaciones de alto impacto, con severos daños provocados por el vertido de sustancias químicas ocasionando reiteradas mortandades de peces. Esta cuenca presenta una alta contaminación orgánica e industrial, como resultado directo o indirecto de distintas actividades humanas, tales como canalizaciones, drenaje de áreas inundables, erosión de

suelos, deficiente planificación urbana, sobreexplotación, contaminación por desechos cloacales, industriales, frigoríficos, difusa por biocidas, etc. Los efluentes liberados por estas actividades aportan materia orgánica y distintos tipos de tóxicos en la cuenca (Zilli y Gagneten, 2005; Gagneten *et al.*, 2007).

La mayor parte de la actividad industrial de la región está basada en industrias lácteas (38%, cuya productividad lechera en la provincia es la segunda a nivel nacional), y curtiembres, junto con industrias manufactureras del cuero (21%) que emplean sales de cromo como agente curtiente. También, se han detectado otros metales pesados (Cu, Pb) provenientes de galvanoplastías y talleres mecánicos instalados en la zona (Gagneten *et al.*, 2007). En los departamentos vinculados al río Salado existen aproximadamente 2600 establecimientos industriales registrados (información de la Dirección de Industrias de la Provincia). Algunas de las curtiembres más importantes de Argentina, cuya actividad data desde 1887, se localizan en esta cuenca y representan el 35% del empleo total de la ciudad de Esperanza (Provincia de Santa Fe). Estos datos indican la importancia de las curtiembres en la economía local (Gagneten *et al.*, 2007). Además, es una región de gran actividad agrícola, ganadera y hortícola. Esta situación fue puesta en evidencia por estudios regionales a distintas escalas (bioensayos, mesocosmos y campo), fundamentalmente centrados en la determinación de concentraciones de metales en diferentes compartimentos (agua, sedimento, biota) y su incidencia sobre la biodiversidad (Marchese, 1997; Marchese y Ezcurra de Drago, 1999; Gallo y Trento, 1999; Gagneten, 2002; Rodríguez *et al.*, 2002; Ceresoli y Gagneten 2003; Gagneten y Ceresoli, 2004; Zilli y Gagneten, 2005; Andreotti y Gagneten, 2006; Gallo *et al.*, 2006; Gagneten *et al.*, 2007, 2008; Gutiérrez *et al.*, 2007; Marchese *et al.*, 2008a, b; Parma *et al.*, 2008, Gagneten e Imhof, 2009; Gagneten y Paggi, 2009; Regaldo *et al.*, 2009). Estos estudios demostraron la presencia de metales tóxicos (Cr, Cu, Pb y en menor medida de Cd) en el río y biota, al mismo tiempo que una pérdida de biodiversidad y el efecto negativo sobre algunos atributos y parámetros a nivel de especies, poblaciones y comunidades.

La acumulación de metales (Cr, Zn, Ni, Cd) por diferentes especies de macrófitas de importancia regional también han sido evaluadas en estudios de fitorremediación aplicados a la construcción de humedales artificiales por Maine *et al.* (2001, 2004, 2005, 2006, 2007), Suñé *et al.*, 2007 y Hadad *et al.*, 2007. Quienes

informaron que la concentración de metales en tejidos de macrófitas presentaba una relación lineal con la concentración de metales en agua y en sedimento, presentando las macrófitas una cinética de sorción de metales muy rápida. Además, Mufarrege *et al.* (2010) y Hadad *et al.* (2010, 2011), analizaron la tolerancia, los efectos y los cambios morfológicos de macrófitas flotantes y enraizadas de la región al ser expuestas a diferentes concentraciones de metales.

Si bien, como se citó anteriormente, existen investigaciones con organismos bentónicos en la región, aún son escasos los biomonitoreos que relacionen la contaminación por metales y los efectos sobre los ensambles de invertebrados bentónicos. Además no hay en nuestro país estudios que evalúen los efectos del Cr y Cu (principales metales registrados en la cuenca del río Salado del Norte) sobre aspectos subletales (como capacidad de acumulación en tejidos, alteraciones en sus ciclos de vida, etc.) en oligoquetos, quironómidos y moluscos de importancia ecológica, ya sea a nivel de estudios mono específicos como multiespecíficos.

#### **III.IV. Metales estudiados**

Entre los contaminantes, los metales pesados se destacan por su alto impacto en los sistemas acuáticos ya que a diferencia de los contaminantes orgánicos, no son biodegradables sino que persisten en el sistema. Hasta al presente, no se dispone de una definición oficialmente aceptada del término metales pesados, ni de un listado o referencia clara y exacta de las propiedades o caracteres de tales elementos que provenga de alguna sociedad científica u organismo referente de alto nivel, como podría ser la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) o la US EPA. (Agencia de Protección Ambiental de los EUA). Una definición difundida es que son aquellos elementos químicos que poseen alto peso atómico y que presentan un peso específico mayor a 4 ( $\text{gr}\cdot\text{cm}^{-3}$ ) (Greenwood y Earnshaw, 2001). No obstante, en ecotoxicología, el término “metales pesados” es generalmente usado para referirse a los metales que causan problemas ambientales, como: Cd, Hg, Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Mn y Ag, entre otros. Los seres vivos necesitan, aunque en pequeñas concentraciones, de muchos de estos metales para el funcionamiento de su metabolismo. Sin embargo, los metales esenciales pueden ser tóxicos para la biota cuando la concentración en el medio acuático excede el nivel umbral, mientras que los no esenciales son muy tóxicos aún en

concentraciones traza (Förstner y Wittmann, 1983). La toxicidad y captación de los metales para los organismos acuáticos depende no sólo de su concentración, biodisponibilidad (especiación química), sino también del tiempo de exposición, factores bióticos (interacción metal-organismo, ej.: superficie-barreras biológicas, tamaño, estadio del ciclo de vida o edad del organismo expuesto, etc.) y abióticos del ambiente (presencia de otros metales o tóxicos, temperatura, pH, OD, COT, dureza, salinidad, etc). De esta manera, ellos pueden encontrarse en los sistemas acuáticos en forma disuelta o particulada, esta última incluye la adsorción en los sedimentos de fondo, materia orgánica suspendida o coloides, etc. La dinámica que regula la transferencia de los metales entre la fase disuelta y particulada depende del pH y del potencial de óxido reducción del sistema. Estas características regulan a su vez la especiación química de los metales en el ambiente (Marcovecchio *et al.*, 2007).

Es conocido, que los metales tienden a acumularse en los sedimentos (Moore, 1991; Rosenberg y Resh, 1993; Wright y Welbourn, 2002), lugar donde habitan y se alimentan los organismos bentónicos, por lo tanto están expuestos directa e indirectamente a ellos. Los iones metálicos suelen ingresar a las células a través de los mismos canales de transporte que los cationes fisiológicamente importantes como el Ca, Mg, Cu y Zn (Castañé *et al.*, 2003).

En esta investigación, se seleccionaron para evaluar el efecto sobre diferentes macroinvertebrados bentónicos, los metales cromo (Cr), cobre (Cu) y plomo (Pb).

El Cr es un metal tóxico muy común en la cuenca del río Salado por el aporte principalmente de efluentes de importantes curtiembres asentadas en dicha cuenca en la provincia de Santa Fe. Además es ampliamente utilizado en la producción de acero y aleaciones, fabricación de pigmentos, preservativos de la madera, industrias textiles y químicas. En las aguas naturales el Cr puede presentar distintos estados de oxidación. Los estados más frecuentes son el Cr (III) y el Cr (VI), siendo este último la especie más tóxica. La toxicidad del Cr (III) se debe a su capacidad para formar complejos con proteínas y compuestos orgánicos, y en concentraciones elevadas tiende a competir con otros metales esenciales por los sitios activos de diversas moléculas (Su *et al.*, 2005). El Cr (VI), es más tóxico que el Cr (III), siendo altamente soluble en agua y forma con el oxígeno compuestos aniónicos oxidantes fuertes, como cromatos y dicromatos. Los cromatos pueden permanecer estables durante largos períodos de tiempo, siempre y cuando el contenido de materia orgánica en el medio sea bajo. Sin embargo si el

contenido de materia orgánica es elevado, reacciona con sustancias oxidables y es reducido a Cr (III). Por lo tanto la reducción del Cr (VI) al Cr (III) ocurre generalmente en la naturaleza. Mientras que el proceso inverso, la oxidación del Cr (III) al Cr (VI), sólo se produce bajo ciertas condiciones (como en presencia de manganeso y poca materia orgánica). La reducción del Cr (VI) al estado trivalente sucede también al ingresar a los tejidos de los organismos, como consecuencia de la libre difusión a través de las membranas celulares de los organismos en cuyo fuerte potencial oxidante radica su mayor toxicidad. La forma hexavalente es cancerígena (Newman, 1998). La Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación Argentina (2004), establece un nivel guía de Cr total como criterio para la protección de la biota acuática, el cual no debe superar los  $0,0025 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cr}$ .

Dentro de los metales esenciales para la supervivencia, crecimiento y reproducción de la biota acuática el Cu es uno de ellos, ya que es parte del sitio activo de numerosas enzimas y proteínas respiratorias (Deplege *et al.*, 1998). Sin embargo, la exposición excesiva de los organismos acuáticos a concentraciones relativamente bajas de Cu puede producir efectos adversos, ya que es altamente tóxico para la mayoría de los invertebrados (Moore, 1991). El Cu se encuentra en los ambientes acuáticos dulceacuícolas naturalmente, así como también por procesos antropogénicos en una variedad de formas minerales (ej.; sulfuros, óxidos y carbonatos). En la cuenca del río Salado, el Cu es volcado principalmente por industrias metalúrgicas, residuos domésticos y agrícolas (por su uso en fungicidas y alguicidas). Su toxicidad sobre los organismos está asociada principalmente a su forma iónica Cu (II) ya que tiene tendencia a formar complejos con ligandos inorgánicos y orgánicos, a formar sulfuros y posee gran afinidad con los materiales carbonatados, arcillas y materia orgánica en los sedimentos (Moore, 1991). Según la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación (2004), el Cu es tóxico a concentraciones superiores de  $0,0066 \text{ mg l}^{-1}$  (a una dureza de  $100 \text{ mg l}^{-1} \text{ CaCO}_3$ , siendo menor su nivel guía a menor dureza).

El Pb es un elemento muy abundante en la corteza terrestre, en la cuenca del río Salado es volcado también principalmente por industrias metalúrgicas, así como por residuos domésticos y naftas. Posee dos estados estables de oxidación, que son el Pb (II) y Pb (IV), siendo en las aguas superficiales naturales el Pb (II) el estado predominante. Sin embargo el pH y el potencial redox, condiciona la especiación del mismo. Tiende a



formar un número de compuestos de baja solubilidad con hidróxidos, carbonatos, sulfuros y en menor medida con sulfatos. También se lo encuentra asociado a ácidos húmicos y fúlvicos, formando quelatos. Su estado inorgánico es considerado cancerígeno (Moore, 1991). La Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación Argentina (2004) establece un nivel guía del Pb como criterio para la protección de la biota acuática, el cual es  $\leq 0,0016 \text{ mg l}^{-1}$ .

Por lo expuesto, frente a esta problemática de contaminación que presenta el río Salado del Norte como sucede también en otros ríos de nuestro país, no existe al presente un protocolo estandarizado para ser utilizado en biomonitoreos en nuestros ríos. Esta es una deuda pendiente por parte de los científicos, ya que se necesitan utilizar pautas e índices propios y no tener que recurrir a aquellos que han sido desarrollados para el Hemisferio Norte (como la U. S. Environmental Protection Agency) donde están basados en estándares según las especies y características ambientales de dicho hemisferio, y de esta manera poder controlar rigurosamente los casos de contaminación.

### **III.V. Objetivo general de la Tesis**

Lograr un conocimiento del grado de perturbación que presenta el río Salado del Norte, determinando cómo la contaminación por metales (Cr, Cu y Pb) afecta el ensamble de invertebrados bentónicos y establecer qué especies actúan como mejores indicadores de la salud ambiental.

En síntesis, esta tesis está estructurada de la siguiente manera:

**Capítulo 1:** Análisis del efecto de metales (Cu, Cr y Pb) sobre macroinvertebrados bentónicos en el río Salado del Norte. Estudio a campo.

**Capítulo 2:** Respuestas de *Chironomus gr. decorus* (Diptera-Chironomidae) a metales (Cr y Cu). Escala microcosmos.

**Capítulo 3:** Toxicidad y bioacumulación del cromo en *Limnodrilus udekemianus* (Oligochaeta: Naididae). Escala microcosmos y mesocosmos.

# Capítulo 1

---

## **Análisis del efecto de metales (Cu, Cr y Pb) sobre macroinvertebrados bentónicos en el río Salado del Norte**

Estudio a Campo

## **Capítulo 1: Análisis del efecto de metales (Cu, Cr y Pb) sobre macroinvertebrados bentónicos en el río Salado del Norte**

### 1.1. Introducción

Uno de los problemas más serios en los sistemas acuáticos, principalmente en ríos, es la acumulación de contaminantes y su consecuente incorporación en las tramas tróficas. Sustancias persistentes, en particular metales pesados y compuestos organoclorados son reconocidos como una amenaza para los organismos acuáticos, incluyendo peces y depredadores ictiófagos tales como aves, mamíferos así como para la salud humana por el consumo de peces de áreas contaminadas (Dirksen *et al.*, 1991; Chapman *et al.*, 1996; Egeler, *et al.*, 2004; Ferrari *et al.*, 2006; Carriquiriborde y Ronco, 2008; Marchese *et al.*, 2008b). Es bien conocido que estas sustancias tóxicas, son transportadas por los ríos en asociación a sedimentos finos (Allan, 1986; Chukwu y Odunzeh, 2006), las cuales pueden ser depositadas y acumuladas en ambientes de áreas inundables durante las crecientes, que pueden a su vez removilizarse y volver al cauce (Walling, *et al.*, 2000; Walling y Owens, 2003). En este sentido, es de fundamental importancia investigar acerca de la acumulación de contaminantes en la zona de inundación de grandes ríos, dado que existe muy poca información al respecto porque en general sólo se analizan los cauces principales considerados como únicos receptores del vertido de contaminantes. Sin embargo, en grandes ríos de llanura el área de inundación cobra un significado muy particular pues estos sistemas inundan extensas áreas durante sus crecientes y los contaminantes pueden acumularse en estas zonas de transición acuático-terrestre (Villar y Bonetto, 2000; Duran y Suicmez, 2007).

Los efectos de metales y otras sustancias tóxicas sobre la comunidad de macroinvertebrados bentónicos en ríos (principalmente en ríos de primeros órdenes) han sido estudiados por numerosos investigadores en el Hemisferio Norte (sintetizado en Hynes, 1960; Hellawell, 1986; Burton, 1991; Rosenberg y Resh, 1993; Phipps *et al.*, 1993; Traunspurger y Drews, 1996; Egeler *et al.*, 1997; Reynoldson y Rodríguez, 1999; Verdonschot y Nijboer, 2004; Dolédec y Statzner, 2010). Mientras que en el Hemisferio Sur, y especialmente en nuestro país, el análisis es más reciente en comparación a la región Holártica y el número de trabajos al respecto ha aumentado en las últimas décadas como parte de biomonitoreos en distintos tipos de ambientes acuáticos con gran

influencia antrópica (Gualdoni y Corigliano, 1991; Miserendino, 1995, 2007; Arocena, 1998; Roldán, 1999; Espíndola *et al.*, 2000; Marques y Barbosa, 2001; Rodríguez Capítulo *et al.*, 1999, 2001, 2002; Figueroa *et al.*, 2003; Paggi *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2002, 2006; Ocón *et al.*, 2008; Marchese *et al.*, 2008a, entre otros).

En relación al sistema del río Paraná Medio, existen estudios que evalúan el efecto de la contaminación orgánica y por algunos metales sobre la estructura de comunidades bentónicas de distintos ambientes lóticos, principalmente comprendidos en la cuenca del río Salado (Marchese, 1997; Marchese y Ezcurra de Drago, 1999; Zilli y Gagneten 2005; Pavé y Marchese 2005; Marchese *et al.*, 2008a). En este contexto, la cuenca del río Salado inferior como se detalló en la introducción general de esta tesis cuenta con una importante contaminación por metales (entre otras sustancias tóxicas), cuyos vertidos han aumentado considerablemente en los últimos años. Sin embargo al presente no existe un protocolo de biomonitorio para determinar la calidad de las aguas de esta cuenca así como tampoco del sistema del río Paraná Medio. En consecuencia, surge la necesidad de realizar biomonitoreos, con el fin de proveer información que permita proponer medidas adecuadas de manejo de la cuenca, para preservar la calidad de los ambientes. Se consideró necesario lograr un estudio más integrado, ampliando el análisis de varios metales en agua y sedimentos de fondo, no sólo en el cauce principal sino también en los humedales marginales y sus efectos sobre los ensamblajes bentónicos. Además se consideró de interés conocer la concentración de metales (Cr y Cu) en tejidos de invertebrados a los efectos de evaluar su grado de acumulación y posible transferencia a través de las tramas tróficas.

Al respecto, se seleccionó un molusco nativo muy representativo de la región como *Pomacea canaliculata* (Gastropoda) perteneciente a la familia Ampullaridae, la cual a su vez es una de las familias más numerosas de Sudamérica. Son un componente muy importante de las comunidades acuáticas, ya que juegan un rol vital en el procesamiento de la materia orgánica y detritos. Su alimentación es variada, son omnívoros, en general voraces, su dieta incluye vegetales, detritos o perifiton (Cuezzo, 2009). En cuanto a la transferencia de materia y energía que realizan en el ambiente, en sus diferentes estadios (embriones o adultos) suelen ser presa de alevinos o adultos de peces, aves y mamíferos, jugando un rol importante en la transferencia de contaminantes a los niveles tróficos superiores. Viven de 3 a 4 años y son de rápido

crecimiento en primavera y verano (Cuezzo, 2009). Por lo tanto, se consideró a esta especie como potencial bioacumulador de metales por lo que el análisis de sus tejidos permitiría obtener información de su capacidad de acumulación de metales presentes en los ambientes estudiados.

1.2. Los objetivos e hipótesis de este capítulo son:

### **Objetivos**

- Analizar comparativamente las concentraciones de metales en agua y sedimentos de fondo en una zona problema (Esperanza) y una de referencia (San Justo), tanto en el cauce principal del río como en su área inundable.
- Relacionar los principales cambios en la estructura del bentos con las concentraciones detectadas de Cr, Cu y Pb en su hábitat.
- Determinar las especies o asociaciones de especies bentónicas indicadoras de calidad de aguas en ambas zonas.
- Analizar comparativamente la concentración de Cr y Cu en hepatopáncreas de *Pomacea canaliculata* (Mollusca) en distintos humedales.

### **Hipótesis**

- ✓ El conocimiento de la concentración de metales en distintos compartimentos (agua y sedimentos de fondo) en el río Salado permitirá inferir las vías de acumulación en el sistema.
- ✓ El área inundable del río Salado actúa como zona de mayor concentración de metales que el cauce principal.
- ✓ La estructura del bentos permitirá establecer un gradiente de calidad del río Salado en el tramo estudiado.

### 1.3. Materiales y métodos

#### 1.3.1. Caracterización del área de estudio

El río Salado del Norte, es un importante curso fluvial del centro noroeste de Argentina, que tiene una cuenca de drenaje de 247.000 km<sup>2</sup> de superficie. Este río recorre las provincias de Salta (donde se origina), Catamarca, Tucumán, Santiago del Estero, Chaco y Santa Fe. En sus nacientes recibe el nombre de Pasaje o Juramento y al ingresar a Santiago del Estero toma el nombre de río Salado del Norte. Es en la provincia de Santa Fe, en las proximidades de la ciudad de Tostado donde se considera a la Cuenca Inferior, con un área aproximada que abarca 29.700 km<sup>2</sup> en la zona centro-norte (29° y 31° 30'S-60° 30'y 62° W) (INCyTH, 1986). La cuenca del río Salado junto con la del río Paraguay constituyen las principales subcuencas tributarias del río Paraná Medio (Manzi y Gallardo, 1970).

El valle del río Salado tiene 4-8 km de ancho, con cauce meandriforme y albardones. La zona baja detrás de los albardones no es homogénea, sino que contiene lagunas, cauces abandonados y pajonales. El caudal medio del río Salado es de 105 m<sup>3</sup>s<sup>-1</sup>. Se caracteriza por una alta conductividad, alcanzando un máximo de 10.000 µS. cm<sup>-3</sup> a la altura de la localidad de Recreo. Respecto al tipo de suelo, predomina el sedimento de fondo limo-arcilloso de pradera, que es enriquecido por abundante materia orgánica (30-40cm de capa superficial). Mientras que en la región inferior, abundan arenas de cuarzo de origen fluvial y por debajo de esta última, existe un paquete sedimentario de limos marrones con concreciones calcáreas (INCyTH, 1986, en Marchese, 1997).

La cuenca inferior del río Salado, recibe los aportes de la subcuenca del río Calchaquí en su margen izquierda, mientras que en su margen derecha recibe los aportes del Canal Principal N°4, de los ríos Las Conchas, San Antonio y especialmente de la subcuenca del arroyo Cululú. En esta última subcuenca, se encuentran importantes asentamientos urbanos, como son las ciudades de Rafaela y Esperanza (entre otras), donde se encuentran las principales industrias que aportan efluentes de distinto origen al río Salado. El arroyo Las Prusianas es el principal afluente del arroyo Cululú, quien aporta la mayor carga de contaminantes, que llegan a su cauce a través de los canales Norte y Sur de la ciudad de Rafaela. El canal Norte transporta los efluentes provenientes de las industrias frigoríficas, lácteas y metalúrgicas, mientras que el canal Sur (que

desemboca en el arroyo Las Prusianas), transporta efluentes cloacales y de industrias lácteas, metalúrgicas y de curtiembres. Por otra parte, los contaminantes provenientes de la ciudad de Esperanza a través del canal 1° de Mayo, transportan la mayor parte de los efluentes industriales y descargas cloacales de Esperanza (Gagneten *et al.*, 2007).

### 1.3.2. Selección de las estaciones de muestreo

Se establecieron dos áreas de muestreo en el río Salado, una de ellas en la zona considerada de referencia, ubicada aguas arriba de la ciudad de San Justo (SJ), y la otra considerada como zona problema, ubicada aguas abajo de la ciudad de Esperanza (E). La zona de referencia ( $30^{\circ} 45' S$ ;  $60^{\circ} 43' O$ ) se encuentra localizada a 153 km al norte de la desembocadura del arroyo Las Prusianas, siguiendo el curso del río (Fig. 1.1).

En cada zona de muestreo se establecieron transectas con 3 estaciones de muestreo, incluyendo el cauce principal del río Salado (estación 1, en el centro del cauce principal) y su llanura de inundación (estaciones 2 y 3, en la llanura de inundación), denominadas a lo largo de este capítulo como: SJ1 (estación 1 en San Justo), SJ2 y SJ3 (estaciones 2 y 3 en San Justo), E1 (estación 1 en Esperanza), E2 y E3 (estaciones 2 y 3 en Esperanza).

Los muestreos fueron realizados en marzo de 2005 (período de aguas altas) y en junio de 2006 (período de aguas bajas), de acuerdo al régimen hidrológico del río Salado (Fig. 1.2). Los datos de las precipitaciones caídas durante el período de estudio fueron suministrados por el Servicio Meteorológico Nacional de la estación Meteorológica más cercana al área de estudio.

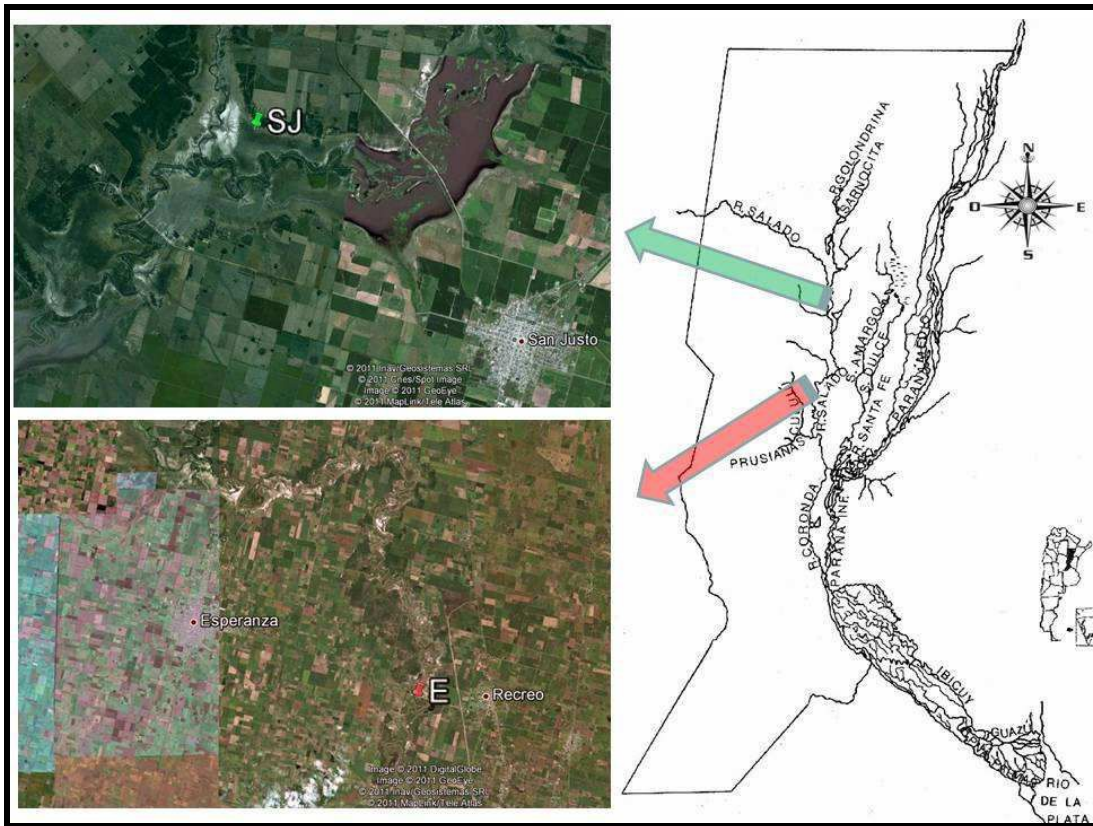


Figura 1.1: Ubicación del área de estudio. SJ: San Justo, E: Esperanza.

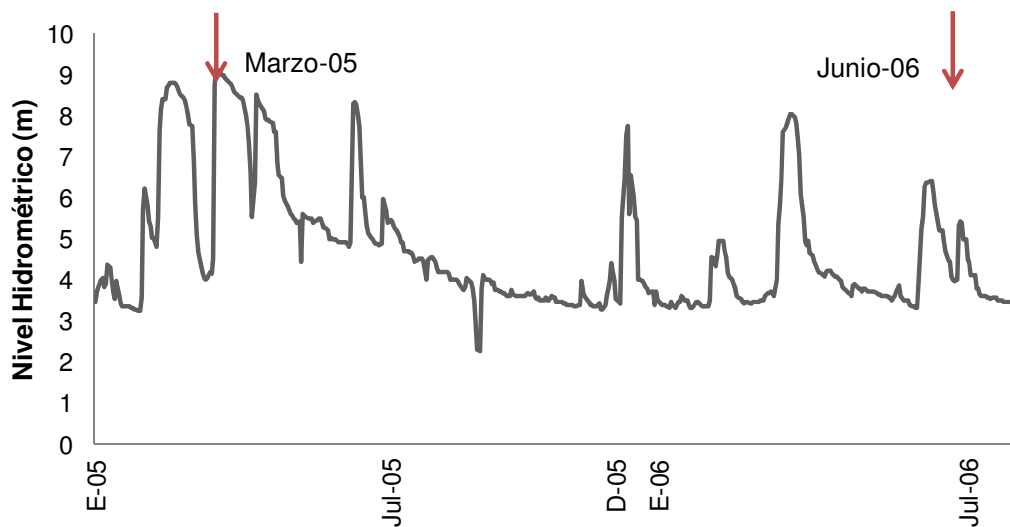


Figura 1.2: Nivel hidrométrico (m) del río Salado de Norte durante el período estudiado. Las flechas indican los muestreos realizados.



### 1.3.3. Determinaciones de variables físicas y químicas, en agua y sedimentos

En cada punto de muestreo se registraron los siguientes parámetros *in situ*: profundidad (con sondaleza), pH, oxígeno disuelto (OD), conductividad, temperatura (T°C), (con multiparámetro Horiba U-10) y transparencia del agua (disco de Secchi). Además se tomaron muestras de agua para medir la demanda bioquímica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>) (método de incubación de la muestra durante 5 días a 20°C), dureza, alcalinidad (métodos titrimétricos), amonio, nitrato, nitrito, fósforo total (PT) (métodos colorimétricos) y clorofila. Estos análisis fueron determinados siguiendo el protocolo de APHA (1998, 2005).

Por otro lado, se extrajeron muestras de sedimento de fondo para el análisis de materia orgánica y granulometría de los sedimentos en cada estación de muestreo, mediante dragas Tamura (322 cm<sup>2</sup>) en el cauce principal y Ekman (225 cm<sup>2</sup>) o "mud snapper" (100 cm<sup>2</sup>), en la llanura de inundación. El contenido de materia orgánica fue analizado por incineración en mufla a 550°C, durante 3 horas (previamente secado en estufa a 60°C, hasta peso constante). Luego cada muestra fue pesada en balanza Ohaus (0,01 mg de precisión) para determinar la materia orgánica mediante diferencia de peso. Mientras que la composición granulométrica fue analizada de acuerdo a la escala de Wentworth (1932).

Se extrajeron también muestras de agua y sedimento de fondo para el análisis de Cr total, Cu y Pb, en cada estación (una muestra por metal). Estos metales fueron seleccionados luego de un muestreo exploratorio para determinar los metales de mayor concentración. Las muestras fueron analizadas por espectrofotometría de absorción atómica (Perkin-Elmer AAnalyst 800), previa digestión de acuerdo al método de la 200.2 (USEPA, 1991).

Todos los envases para la obtención de las muestras, fueron lavados con ácido nítrico y agua destilada y previamente a la toma de muestras, enjuagados con el agua del lugar. Las muestras se mantuvieron refrigeradas hasta su análisis y fueron transportadas hasta el laboratorio en conservadoras y en total oscuridad.

El análisis estadístico de los datos consistió en el ordenamiento de las estaciones de muestreo según las variables físicas y químicas mediante el Análisis de Componentes Principales (ACP) y correlaciones de Spearman entre dichas variables.

Para estos análisis se utilizó el programa estadístico Multivariate Statistical Package (MVSP 3.2, Kovach, 2001) e InfoStat (InfoStat 1.1, FCA-UNC, 2004).

La medición de los parámetros analizados “in situ” en el campo y la determinación de materia orgánica de los sedimentos fue realizada por la tesista. Las determinaciones de DBO<sub>5</sub>, DQO, dureza, amonio, alcalinidad, nitrato, nitrito, fósforo total y alcalinidad fueron realizados por la Bqca. Alicia Loteste (Laboratorio de Química del INALI), mientras que el contenido de clorofila por la Mag. Graciela Paporello (Laboratorio de vegetación del INALI). La determinación de la granulometría de los sedimentos fue realizada por el Sr. Lionel Mehaudy (Laboratorio de Limnología Física del INALI). Mientras que los análisis de metales fueron realizados por personal del SECEGRIN, Centro Científico Tecnológico CONICET Santa Fe.

#### 1.3.4. *Concentración de metales en moluscos acuáticos en humedales*

Se recolectaron ejemplares adultos de *P. canaliculata* (Mollusca, Gastropoda) y muestras de agua subsuperficial en un humedal del río Salado y en humedales relacionados al río Coronda y al río Miní (cauces secundarios del río Paraná Medio), desde noviembre de 2009 a abril de 2010. Estos ambientes fueron seleccionados para analizar comparativamente las concentraciones de metales (Cr y Cu) en tejidos de moluscos entre una zona perturbada (río Salado) y humedales no impactados directamente por acción antrópica (Fig. 1.3 a y b). Los ejemplares se recolectaron manualmente y fueron transportados al laboratorio en recipientes con agua del lugar. Una vez en el laboratorio fueron alojados en recipientes con agua limpia para purgar su contenido intestinal, durante 8 horas. Posteriormente los caracoles fueron crioanestesiados con hielo y enjuagados. Para la obtención del hepatopáncreas de cada ejemplar se realizó una cuidadosa disección para evitar contaminación y luego fueron colocados en cápsulas de aluminio y secados en estufa (60°C) hasta peso constante (microbalanza OHAUS). Una vez secas, las muestras refrigeradas fueron enviadas a analizar en una conservadora.

Las concentraciones de Cr total y Cu en las muestras de agua y hepatopáncreas (por triplicado para cada metal y estación) fueron determinadas por espectrómetro de emisión por plasma en laboratorio especializado (ICP, Shimadzu-1000 III, Laboratorio de Análisis Químicos-LANAQUI, Bahía Blanca, Bs. As). Todos los materiales

utilizados fueron previamente lavados con 2N HNO<sub>3</sub>, para evitar la contaminación de las muestras durante la disección.

Los análisis estadísticos de los datos consistieron en el análisis de la varianza (ANOVA), seguido del test de comparación múltiple LSD Fisher para determinar las diferencias significativas en las concentraciones de metales en agua y caracoles, entre las estaciones de muestreo. Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza fueron comprobados mediante los residuos (test de Kolmogorov-Smirnov y de Levene, respectivamente), los datos fueron transformados previamente al log<sub>10</sub>. Cuando los datos no fueron normalmente distribuidos se aplicó el test Kruskal-Wallis, seguido de un test de comparación múltiple, con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . Todos los análisis se realizaron utilizando el programa software STATISTICA (versión 7.1, StatSoft, Inc. 2005).





Figura 1.3. a) Ubicación de los humedales estudiados. S: río Salado, M: río Miní y C: río Coronda. b): Fotografías de una de las zonas de muestreo (C), y ejemplares de *P. canaliculata* (masas ovígeras y adultos).

#### 1.3.5. Muestreos del bentos e identificación de los macroinvertebrados bentónicos

La extracción de las muestras del bentos en cada estación de muestreo fue realizada mediante las dragas anteriormente mencionadas para sedimentos de fondo. Las muestras fueron fijadas *in situ* en formol al 10% y transportadas en recipientes plásticos hasta el laboratorio, donde fueron filtradas mediante un tamiz de 200  $\mu\text{m}$  de abertura de malla. En cada estación de muestreo se tomaron 3 unidades muestrales.

El análisis de los invertebrados bentónicos fue realizado luego de extraerlos del sedimento manualmente bajo lupa (10x), habiendo sido previamente teñidos con eritrosina para facilitar la observación, siendo el material preservado en alcohol al 70%. La observación de los organismos fue realizada bajo microscopio óptico estándar y su identificación taxonómica fue analizada hasta el menor nivel taxonómico posible. Para la determinación taxonómica de los organismos del bentos se utilizaron las claves de

Brinkhurst y Marchese (1991), Lopretto y Tell (1995), Trivinho-Strixino y Strixino (1995), y Domínguez y Fernández (2009).

#### 1.3.6. *Análisis cuali y cuantitativo del bentos*

En cada estación de muestreo se estimó densidad ( $\text{ind.m}^{-2}$ ), diversidad específica (índice de Shannon-Wiener), riqueza y equitatividad. Se analizó además diversidad alfa, beta y gama.

Para analizar la estructura trófica se clasificaron a los organismos en grupos funcionales tróficos (GFT) teniendo en cuenta la tabla de Merrit y Cummins (1996). Los índices bióticos aplicados (ver Anexo) para determinar la calidad del agua de las estaciones fueron: **Iberic Biological Monitoring Working Party** (IBMWP, Alba-Tercedor *et. al*, 2002), **Índice de Macroinvertebrados para Ríos Pampeanos** (IMRP, Rodríguez Capitulo, 1999), **Average Score Per Taxón** (ASPT, Friedich *et.al*, 1996) y la relación: densidad de oligoquetos/densidad total (DT) y densidad de quironómidos/DT.

Se realizó ANOVA de dos vías (factores: lugar y fecha de muestreo) y test a posteriori de LSD-Fisher, para determinar si existen diferencias significativas en los atributos del bentos (densidad total y riqueza de especies) entre las estaciones y fechas de muestreo. Se analizaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza como fue explicado en el apartado anterior. Se utilizó el Análisis de Correspondencia Detendenciado (Detrended Correspondence Analysis, DCA) para la ordenación de las estaciones y determinación de un gradiente de contaminación según la distribución de los taxa y atributos del bentos. Además, se hicieron correlaciones de Spearman, para relacionar las variables ambientales y las biológicas como densidad total y riqueza de especies y se aplicó la distancia euclidiana a la densidad de los taxa según las estaciones y años de muestreo, obteniéndose el dendrograma correspondiente utilizando el método UPGMA (promedio de pares no ponderados). Previo a los análisis, los datos fueron transformados a  $\log_{10}(x+1)$ . Para estos análisis, fue utilizado el software STATISTICA (versión 7.1, StatSoft, Inc. 2005), Multivariate Statistical Package (MVSP, versión 3.13, Kovach, 2001) e InfoStat (InfoStat 1.1, FCA-UNC, 2004).

1.4. Resultados

1.4.1. Caracterización del agua

La **profundidad** (Fig. 1.4), varió entre 0,50 a 3,10 m en el muestreo del 2005 (aguas altas) y disminuyó en el 2006 (aguas bajas), siendo entre 0,15 a 2,54 m. En ambos períodos, la profundidad fue mayor en las estaciones tomadas como referencia de SJ.

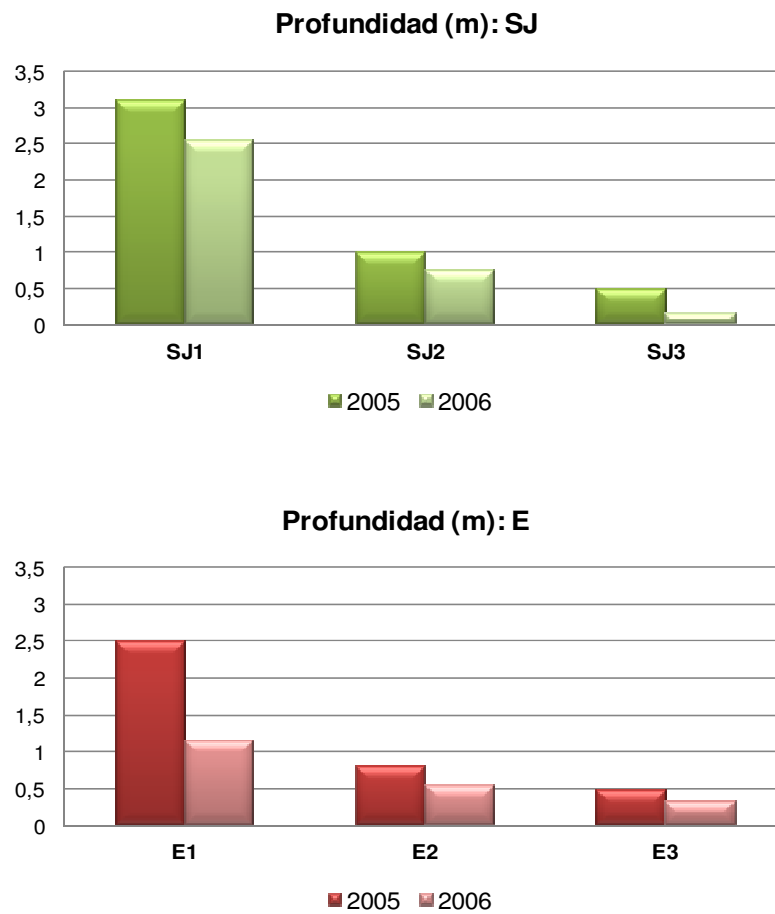


Figura 1.4: Valores de profundidad (m) en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), en ambos períodos de muestreo. SJ1: San Justo, estación 1 en cauce principal. SJ2 y SJ3: San Justo, estaciones 2 y 3 de la llanura de inundación. E1: Esperanza, estación 1 en cauce principal. E2 y E3: Esperanza, estaciones 2 y 3 de la llanura de inundación. Estas referencias, se repiten en las siguientes figuras.

La **temperatura** (Fig. 1.5) fue mayor en marzo de 2005, variando entre 20,5 a 26,2 °C, mientras que disminuyó en junio del 2006, variando entre 14,2 a 19 °C, siendo semejantes los valores para ambas zonas.

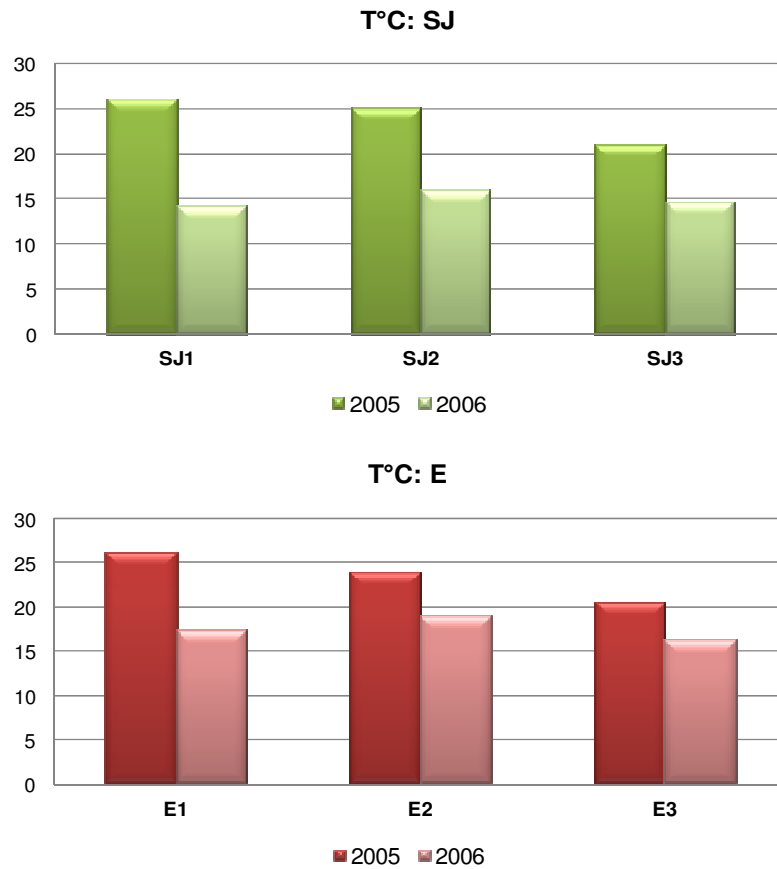


Figura 1.5: Valores de temperatura (°C) en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), en ambos períodos de muestreo.

La **transparencia** (cm) (Fig. 1.6), osciló entre 10 y 20 cm en el 2005, y entre 9 a 35 cm en el 2006. En ambos períodos y zonas de muestreo, la transparencia fue menor en el cauce principal (lo cual es común debido a la mayor presencia de material en suspensión) y mayor en las estaciones de la llanura de inundación, siendo el máximo en la E3.

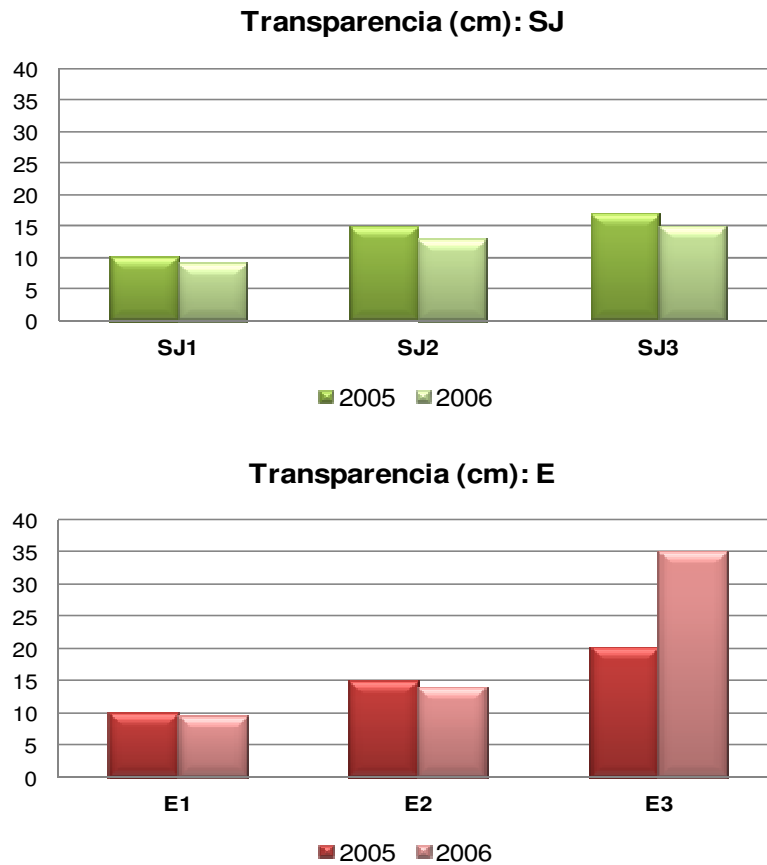


Figura 1.6: Valores de transparencia (cm) en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), en ambos períodos de muestreo.

La **conductividad** (Fig. 1.7) mostró un amplio rango, desde 150 a 3450  $\mu\text{Scm}^{-1}$  en el 2005, y desde 145 a 2540  $\mu\text{Scm}^{-1}$  en el 2006, siendo en general menor en el último muestreo de aguas bajas, sobre todo en SJ, mientras que los mayores valores (desde 1780 a 3450  $\mu\text{Scm}^{-1}$ ) fueron registrados en las estaciones del cauce principal de ambas zonas.



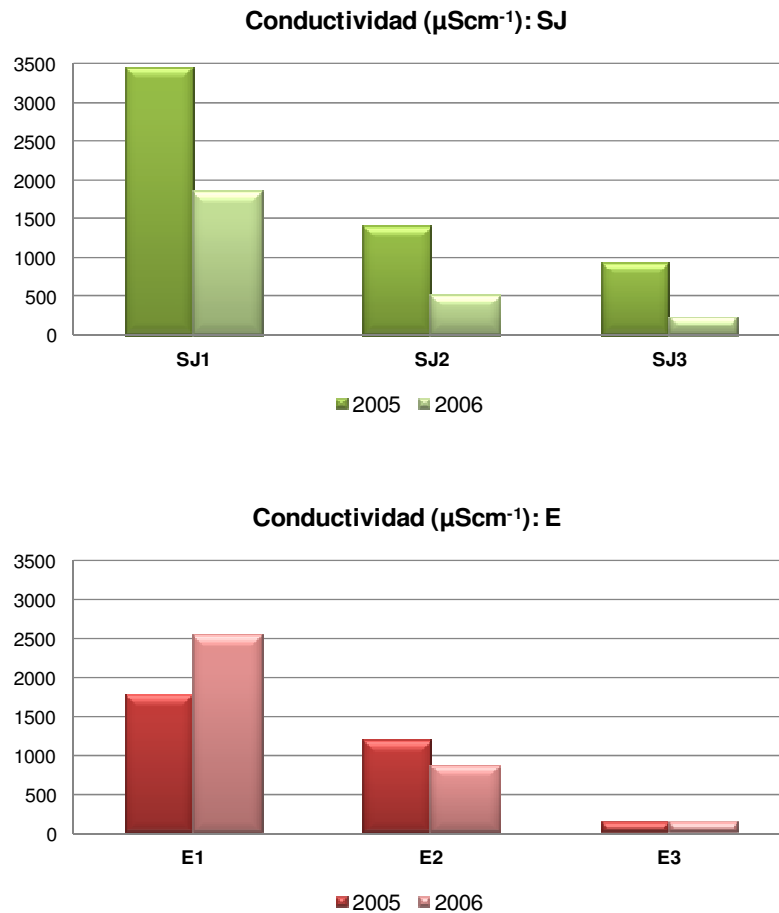


Figura 1.7: Valores de conductividad ( $\mu\text{Scm}^{-1}$ ) en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), en ambos períodos de muestreo.

El **pH** (Fig. 1.8) fue mayor en las estaciones de SJ en el 2005, variando entre 6,6 y 7,8, mientras que en 2006 los valores fueron mayores en las estaciones de E, variando entre 6,1 y 8,15. El valor más bajo registrado durante todo el estudio (6,1) correspondió a la estación SJ3, en el último muestreo.

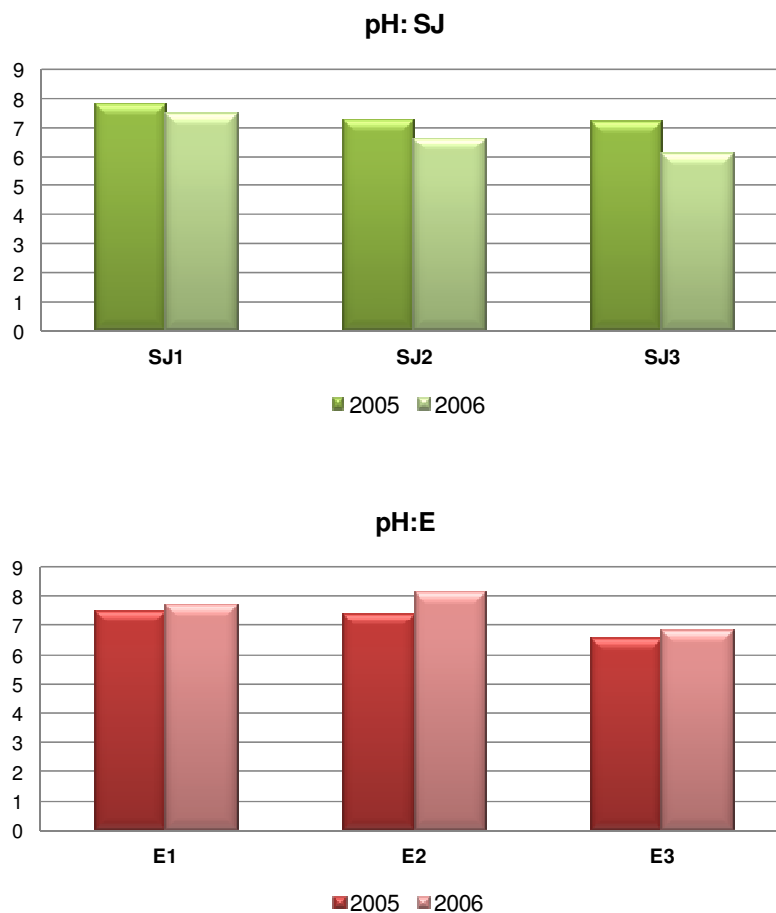


Figura 1.8: Valores de pH en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), en ambos períodos de muestreo.

El **oxígeno disuelto (OD)** (Fig. 1.9) mostró un amplio rango, siendo el mínimo y el máximo registro de 2,1 a 9,0 mg l<sup>-1</sup>, respectivamente en 2005 y entre 2,4 a 8,9 mg l<sup>-1</sup> en 2006. En general el OD obtuvo valores mayores a 6 mg l<sup>-1</sup> en SJ en ambos períodos estudiados, a excepción de SJ3 en el período de aguas bajas (2006). En E, se registraron en general menores valores de OD, siendo muy bajos en las estaciones de la llanura de inundación (alrededor de 2 mg l<sup>-1</sup>), a excepción de la E2, en 2006 donde se registró 8,9 mg l<sup>-1</sup>. En cuanto al OD en E1, fueron valores alrededor de 6 mg l<sup>-1</sup>, siendo mayor en el período de aguas altas.

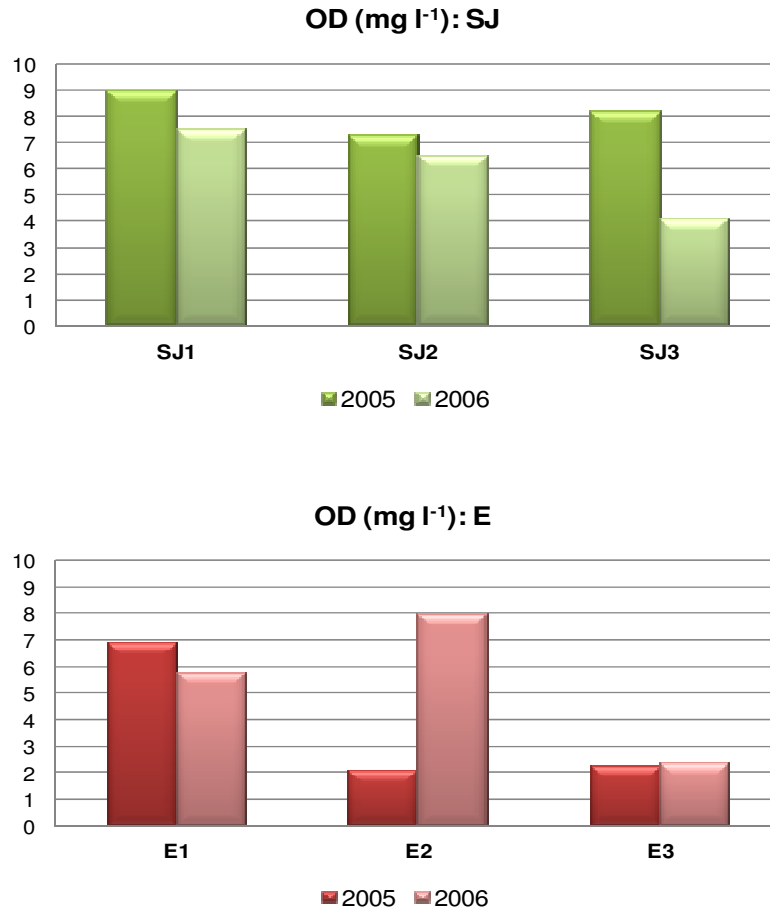


Figura 1.9: Valores de OD (mg l<sup>-1</sup>) en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), en ambos períodos de muestreo.

La **DBO<sub>5</sub>** (Fig. 1.10), fue mayor en el período 2005, registrándose los mayores valores en las estaciones de E. El rango de ambas zonas en este período fue, mínimo 4,86 y máximo 78,99 mg l<sup>-1</sup>, siendo este último valor el máximo registrado durante todo el estudio (E3, en la cual se observó la presencia de abundante ganado vacuno). Mientras que en el 2006, los valores registrados fueron: 1,82 a 16,54 mg l<sup>-1</sup>, también este último valor corresponde a E3.

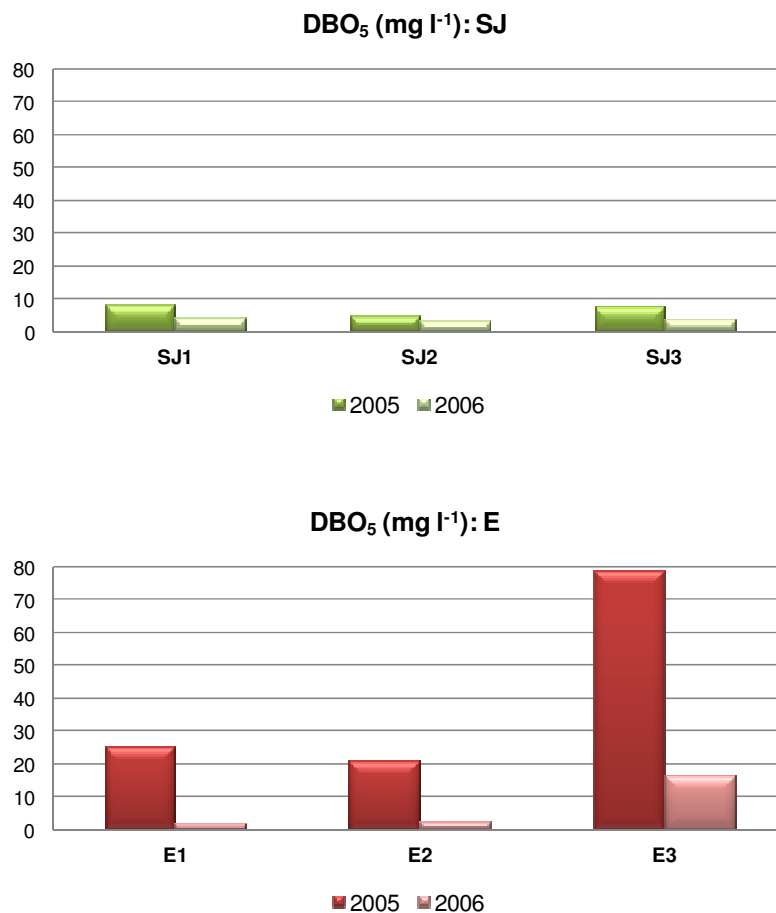


Figura 1.10: Valores de DBO<sub>5</sub> (mg l<sup>-1</sup>) en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), en ambos períodos de muestreo.

Los valores de **dureza** (Fig. 1.11) son altos, habiendo oscilado en 2005 entre 108 a 520 mg l<sup>-1</sup> Ca CO<sub>3</sub> y en el 2006, entre 130 y 496 mg l<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>, correspondiendo los máximos valores en ambos períodos a SJ1. En general en SJ, la dureza disminuyó en las estaciones de la llanura de inundación, mientras que en E en el 1° muestro la dureza en todas las estaciones fue semejante (con el mayor valor en E3). Luego en el 2° muestreo, disminuyó en las estaciones de la llanura de inundación.

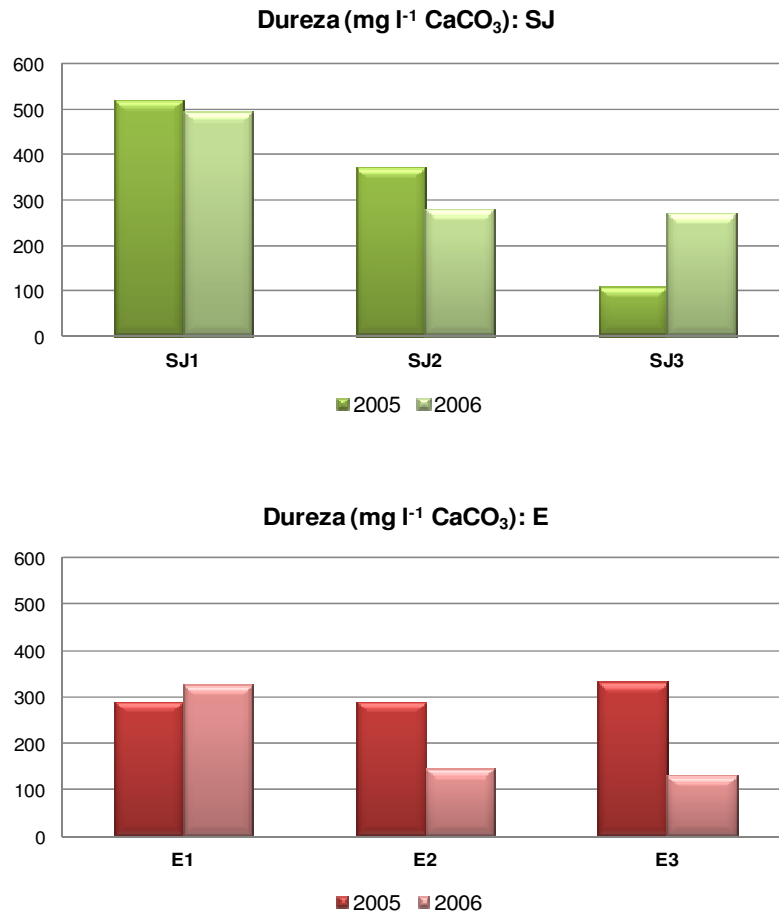


Figura 1.11: Valores de dureza (mg l<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>) en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), en ambos períodos de muestreo.

La **alcalinidad** (Fig. 1.12), siguió un patrón semejante a la dureza sobre todo en las estaciones de SJ y E en el último muestreo, debido a la presencia de bicarbonatos. Los valores registrados en el 2005 oscilaron entre 132 y 376 mg l<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>, mientras que en el 2006, la alcalinidad disminuyó notablemente en todas las estaciones (variando entre 52 a 170 mg l<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>). Sin embargo el patrón en este caso fue el mismo, con valores mayores en las estaciones del cauce principal y menores en la llanura de inundación.

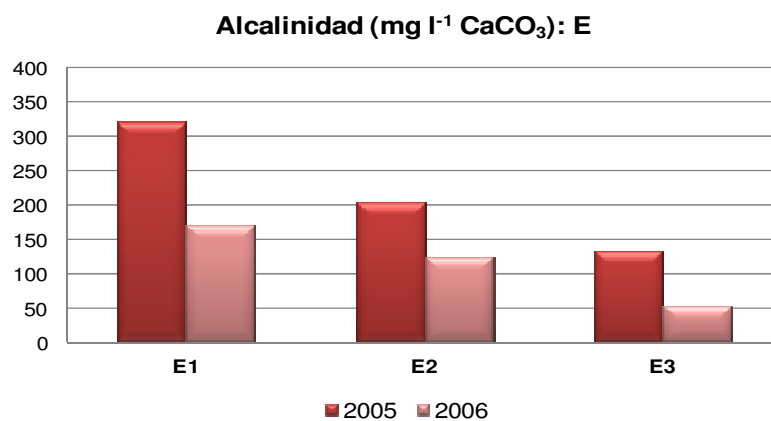
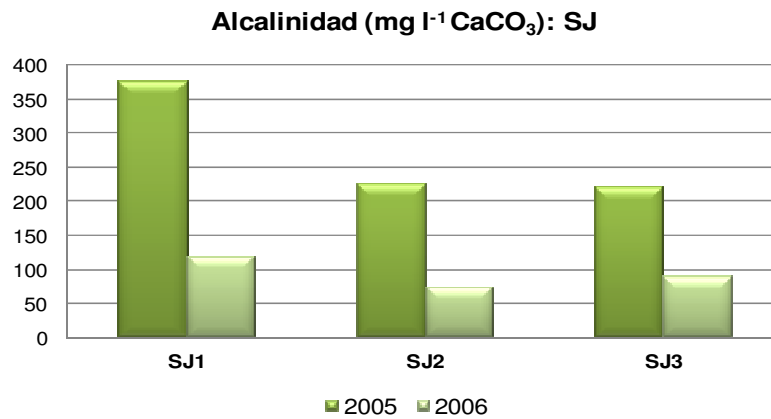


Figura 1.12: Valores de alcalinidad (mg l<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>) en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), en ambos períodos de muestreo.

En cuanto a los nutrientes, el **amonio** (Fig. 1.13), presentó mayores valores en el 1° muestreo en ambas zonas, indicando una mayor mineralización de la materia orgánica. Los valores en dicho muestreo fueron entre 1,52 y 2,1 mg l<sup>-1</sup>. Mientras que en el 2006 el amonio disminuyó, oscilando entre 0,33 y 1,4 mg l<sup>-1</sup>, con valores semejantes en SJ pero no en E, donde las mayores concentraciones se dieron en las estaciones de la llanura de inundación.

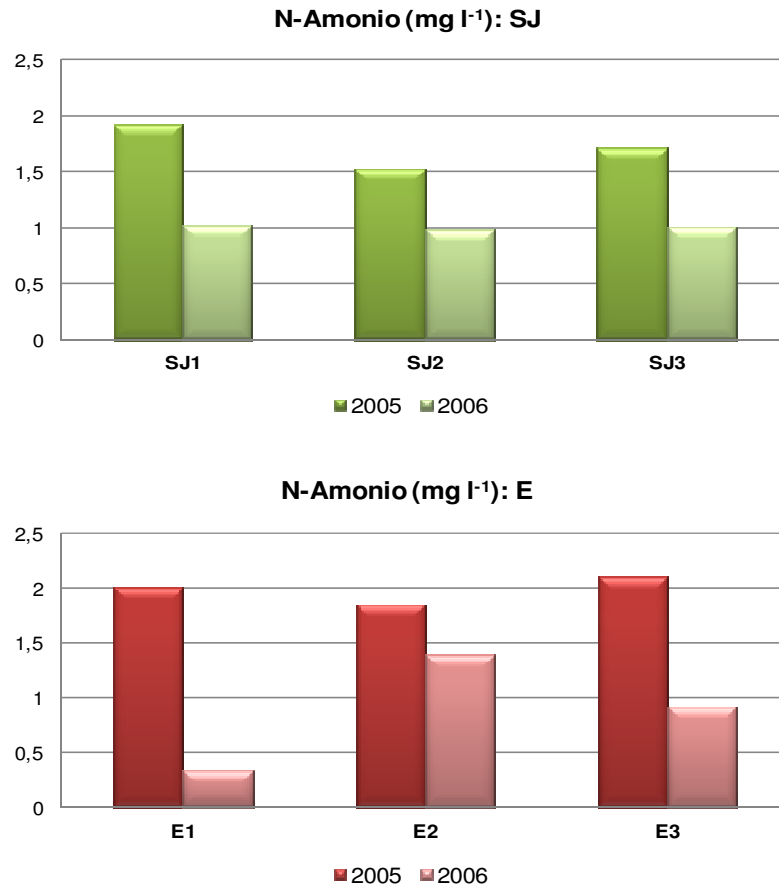


Figura 1.13: Valores de amonio (mg l<sup>-1</sup>) en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), en ambos períodos de muestreo.

El **nitrito** (Fig. 1.14), en el 2005 registró concentraciones entre 0,4 y 3,4 mg l<sup>-1</sup>, siendo menores en las estaciones de SJ, mientras que en el 2006 osciló entre 0,02 y 4,2 mg l<sup>-1</sup> (alcanzando este último valor tanto en SJ3 como en E2). En ambos períodos las mayores concentraciones se registraron en las estaciones de la llanura de inundación, principalmente de E.

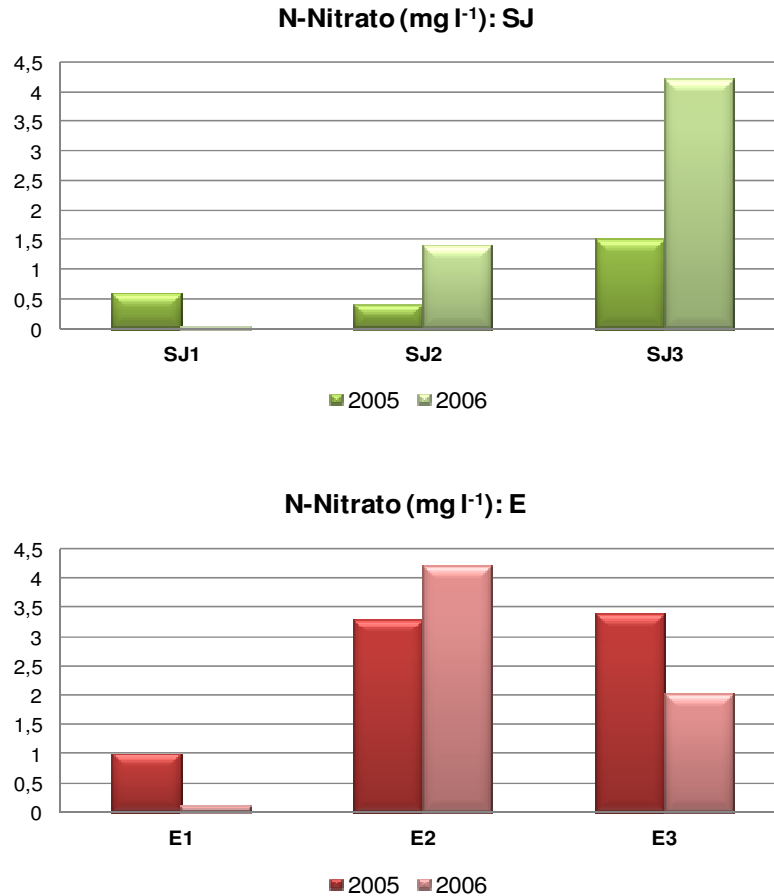
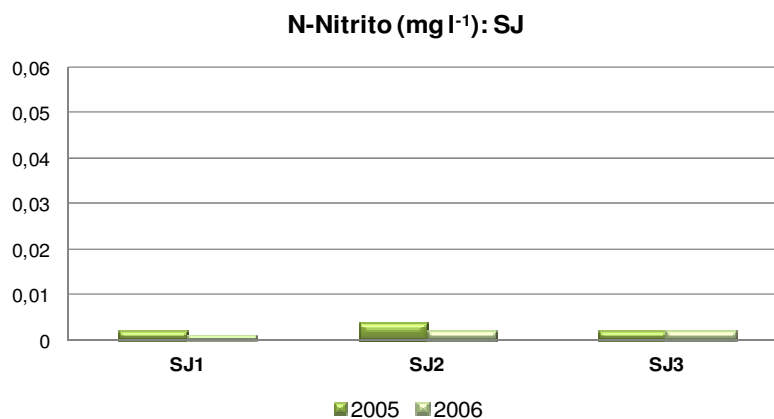


Figura 1.14: Valores de nitrato (mg l<sup>-1</sup>) en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), en ambos períodos de muestreo.

El **nitrito** (Fig. 1.15), obtuvo los mayores valores en las estaciones de E, en el último muestreo, sin embargo en la E3 disminuyó notablemente. Las concentraciones en el 2005 fueron entre 0,001 y 0,006 mg l<sup>-1</sup>, mientras que en 2006 oscilaron entre 0,001 y 0,053 mg l<sup>-1</sup>(máximo valor alcanzado en todo el estudio en E2).





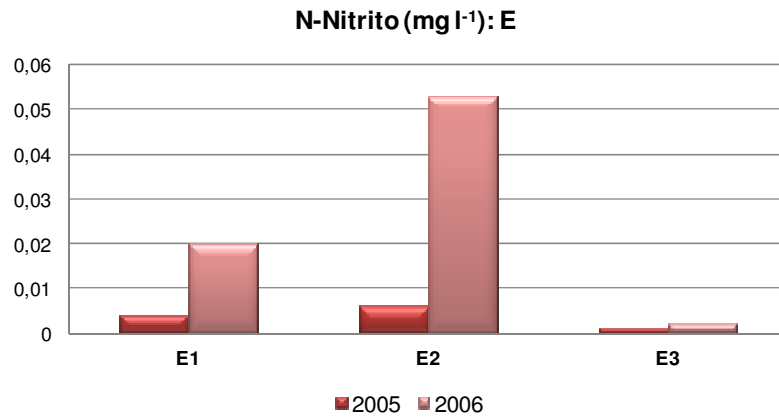
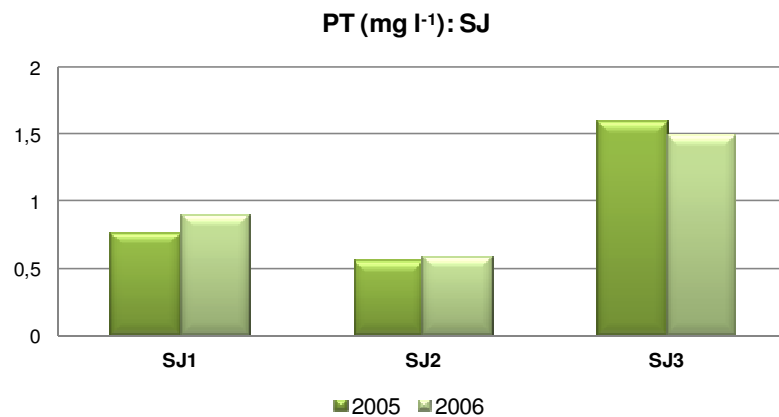


Figura 1.15: Valores de nitrito (mg l<sup>-1</sup>) en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), en ambos períodos de muestreo.

El **fósforo total** (PT) (Fig. 1.16), reveló concentraciones semejantes en todas las estaciones de SJ en ambos muestreos (siendo mayores en SJ3), mientras que en las estaciones de E aumentó en el 2° muestreo, con las mayores concentraciones en las estaciones de la llanura de inundación. Los valores en 2005 oscilaron entre 0,56 y 1,6 mg l<sup>-1</sup> y entre 0,59 y 1,75 mg l<sup>-1</sup> en el 2006.



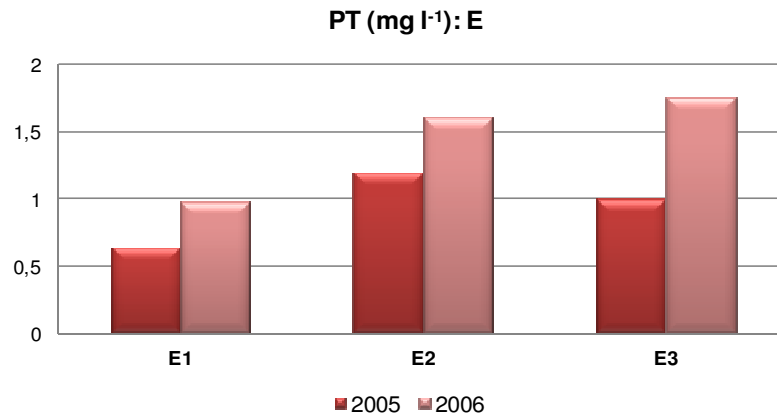


Figura 1.16: Valores de PT (mg l<sup>-1</sup>) en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), en ambos períodos de muestreo.

La **clorofila a** (Fig. 1.17), en el 2005 obtuvo concentraciones entre 0,73 y 14,81 mg.m<sup>-3</sup>, alcanzando los mayores valores en las estaciones de SJ (siendo máximo en SJ1), luego en el 2006 la clorofila disminuyó en todas las estaciones, sus valores oscilaron entre 0,12 y 3,03 mg.m<sup>-3</sup>.

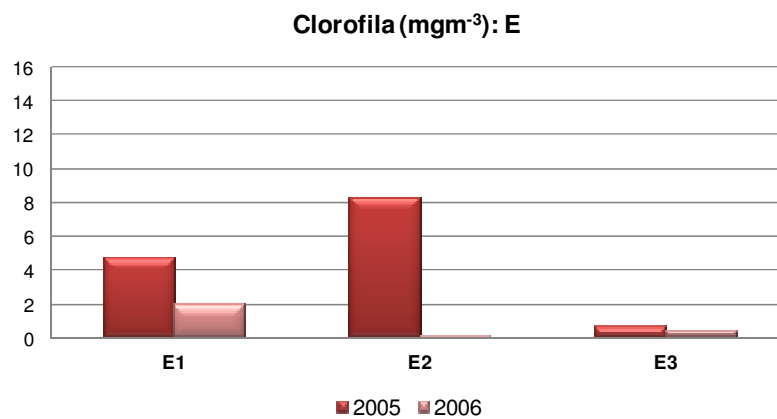
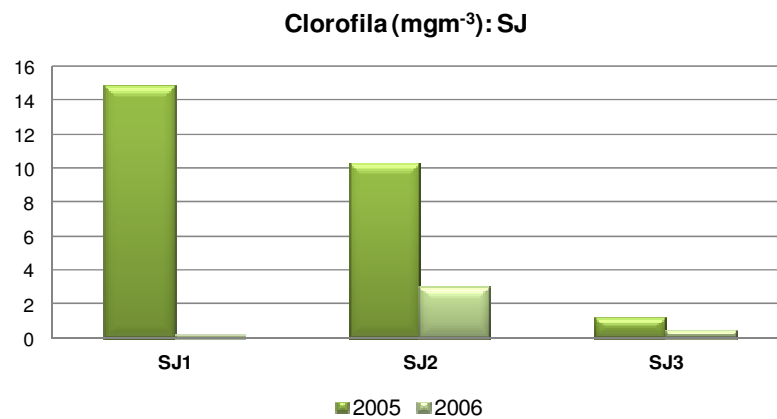


Figura 1.17: Valores de clorofila a ( $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), en ambos períodos de muestreo.

#### 1.4.2. Caracterización del sedimento de fondo

La **composición granulométrica** del sedimento de fondo fue muy característica de este río (Fig. 1.18), con sedimento arenoso en las estaciones del cauce principal (>98% de arena) y limo-arcilloso en las estaciones de la llanura de inundación, presentando semejantes porcentajes de limo y arcilla en la estación 2 de ambas zonas, mientras que en la estación 3, en SJ3 se registró mayor porcentaje de arcilla en relación a E3.

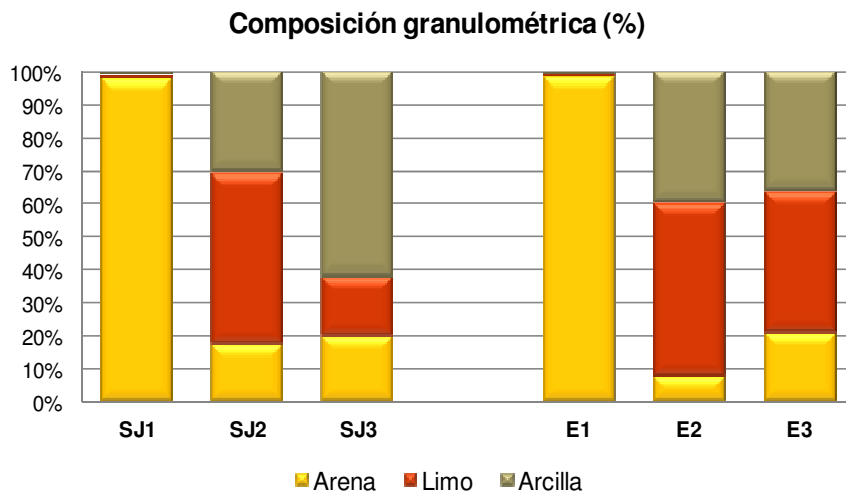


Figura 1.18: Composición granulométrica (% de arena, arcilla y limo), en cada estación de muestreo.

En relación al contenido de **materia orgánica** (Fig. 1.19), observamos un patrón también característico del río, variando entre 0,4 a 13,5 %, siendo las estaciones arenosas del cauce principal las que presentaron menores porcentajes de materia orgánica, mientras que las estaciones de la llanura de inundación registraron mayores porcentajes, con el máximo valor registrado en SJ3.

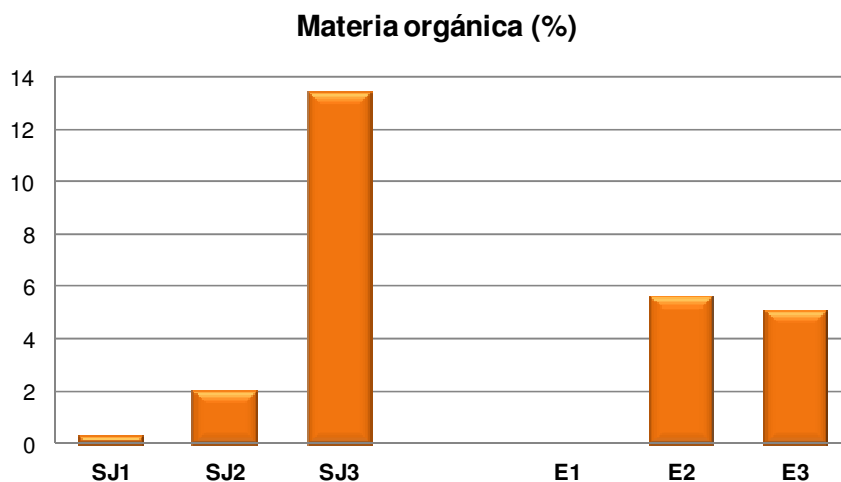


Figura 1.19: Contenido de materia orgánica (%), en cada estación de muestreo.

#### 1.4.3. Concentraciones de metales en agua y sedimentos

En la mayoría de los casos, las concentraciones fueron mayores al límite de detección (LD) y de cuantificación (LQ) del método empleado, salvo en pocas ocasiones las concentraciones fueron inferiores al LD y en tal caso se indican como ND (no detectado). A continuación se detallan las concentraciones de cada metal y compartimento.

##### *Metales en agua*

**Cromo total (Cr):** en la Fig. 1.20, se observan altas concentraciones de Cr, siendo mayores en el 1° muestreo y en las estaciones de la llanura de inundación de la zona considerada de referencia (SJ). Las concentraciones en el 1° muestreo oscilaron entre 0,0175 y 0,162 mg l<sup>-1</sup>Cr (este último valor corresponde a SJ3). Mientras que en el 2° muestreo, oscilaron entre 0,003 y 0,011 mg l<sup>-1</sup>Cr.

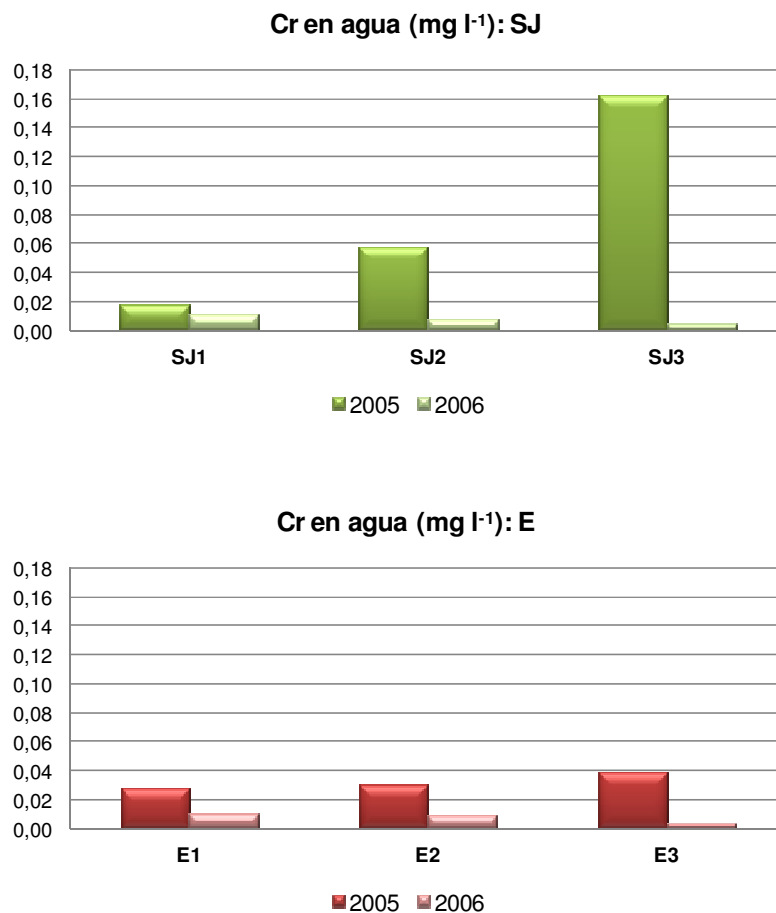


Figura 1.20: Concentraciones de Cr total en agua (mg l<sup>-1</sup>), en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), en ambos períodos de muestreo.

**Cobre (Cu):** las concentraciones en agua (Fig. 1.21) revelaron altos valores de este metal en ambas zonas, siendo mayores también en el 1° muestreo. Las mismas variaron entre 0,025 y 0,0645 mg l<sup>-1</sup>Cu, este último valor corresponde a E1. Mientras que en el 2° muestreo oscilaron entre 0,005 y 0,016 mg l<sup>-1</sup>Cu.

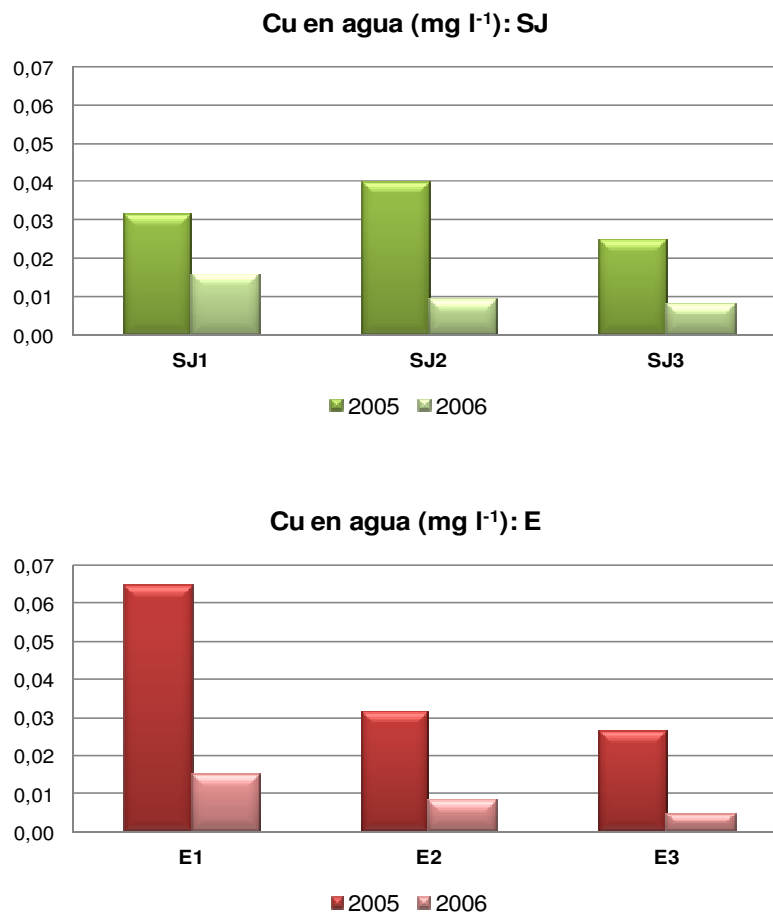


Figura 1.21: Concentraciones de Cu en agua (mg l<sup>-1</sup>), en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), en ambos períodos de muestreo.

**Plomo (Pb):** se registraron también las mayores concentraciones en el 1° muestreo, en este caso mayores en E (Fig. 1.22). Así en el 1° muestreo las concentraciones oscilaron entre 0,0055 a 0,0695 mg l<sup>-1</sup>Pb, este último valor corresponde a E1. Mientras que en el 2° muestreo encontramos desde ND a 0,0095 mg l<sup>-1</sup>Pb.

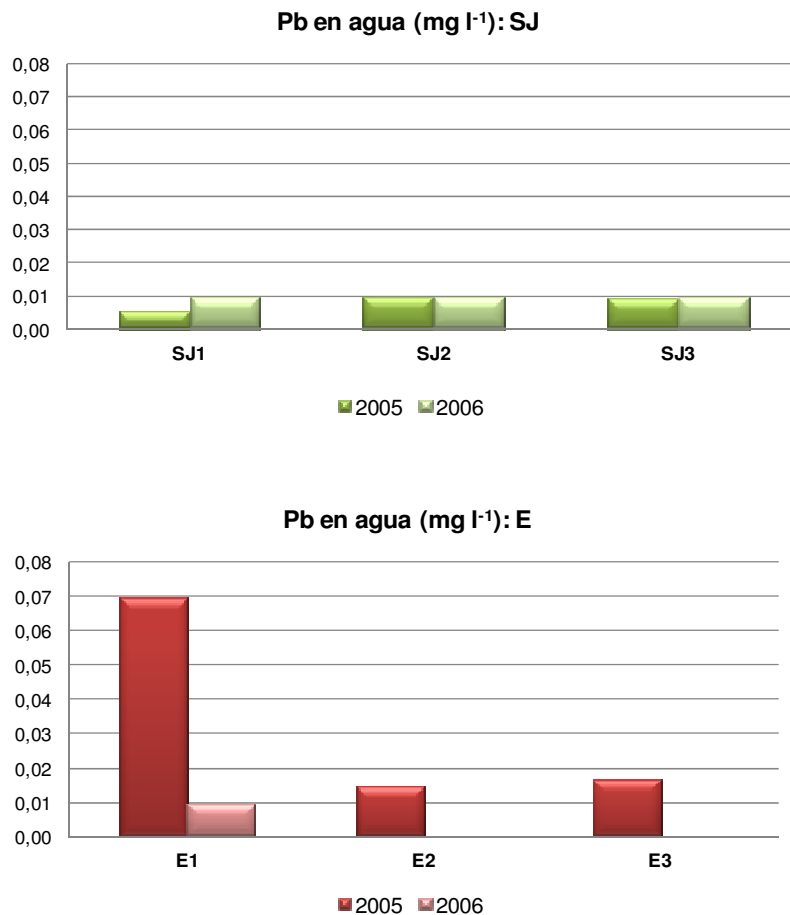


Figura 1.22: Concentraciones de Pb en agua (mg l<sup>-1</sup>), en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), en ambos períodos de muestreo.

*Metales en sedimentos de fondo*

**Cromo total:** (Fig. 1.23) al igual que lo registrado en agua, las mayores concentraciones se obtuvieron en las estaciones de la llanura de inundación de la zona considerada de referencia (SJ2 y SJ3). Mientras que en E, las concentraciones fueron muy variables, pero se registró Cr también en el cauce principal (E1). Los valores en el 1° muestreo oscilaron entre 1,3 y 21,4 mg kg<sup>-1</sup> Cr, mientras que en el 2° muestreo entre 1,1 y 25 mg kg<sup>-1</sup>Cr, en ambos períodos las máximas concentraciones correspondieron a SJ2.

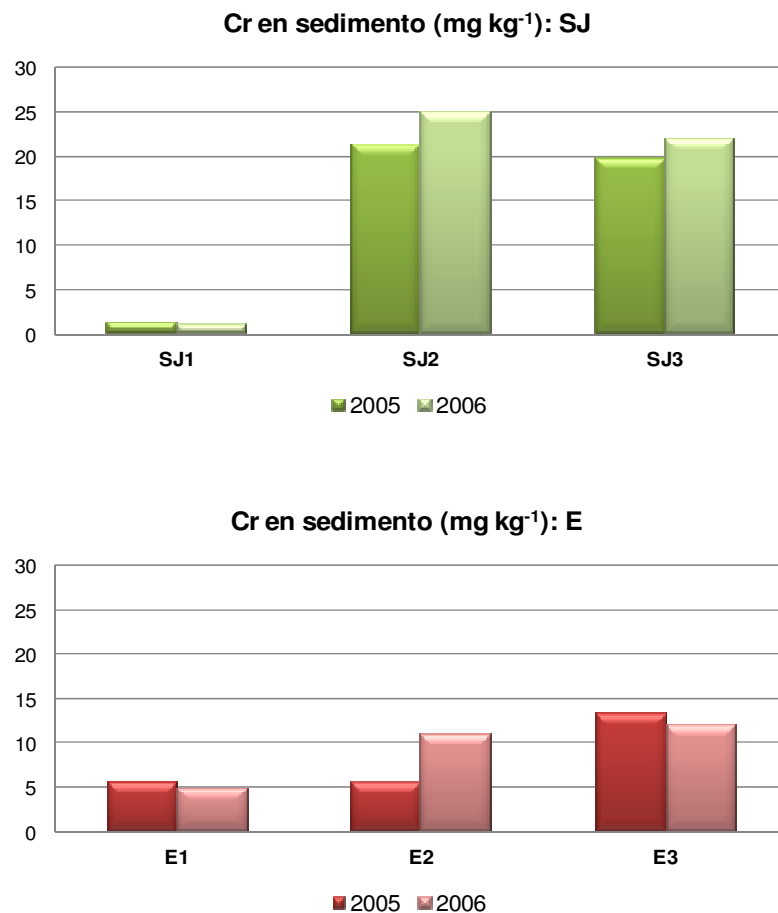


Figura 1.23: Concentraciones de Cr total en sedimento (mg kg<sup>-1</sup>), en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), en ambos períodos de muestreo.

**Cobre:** las concentraciones (Fig. 1.24) también fueron en general mayores en las estaciones de la llanura de inundación de SJ, sin embargo también se registró Cu en el cauce de E. Los valores en el 1° muestreo oscilaron entre 2,7 y 19,3 mg kg<sup>-1</sup> Cu y en el 2° muestreo entre 1,1 y 30 mg kg<sup>-1</sup> Cu (este máximo valor corresponde a SJ3).



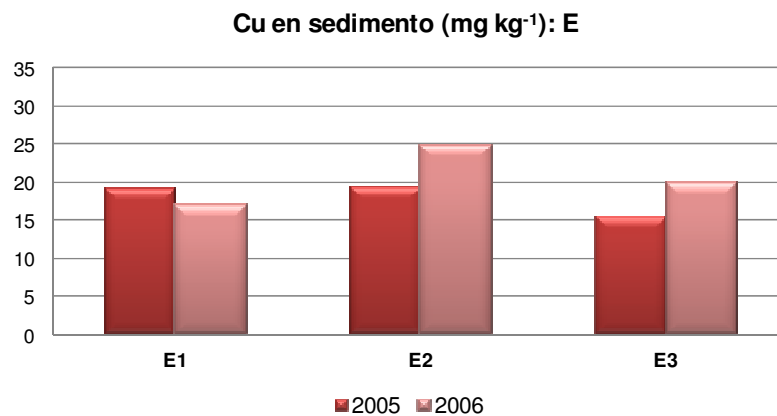
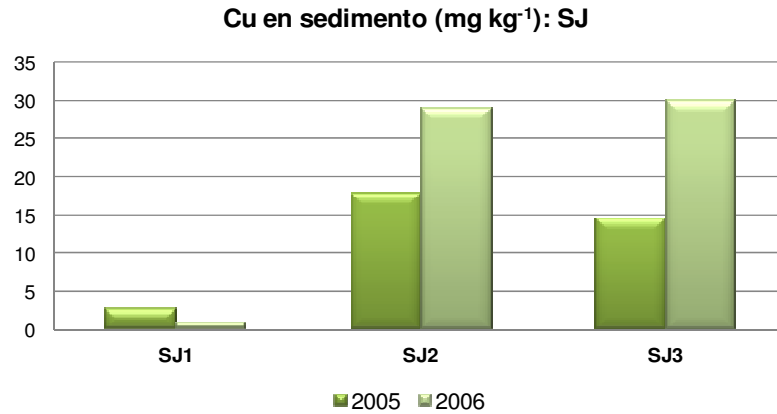
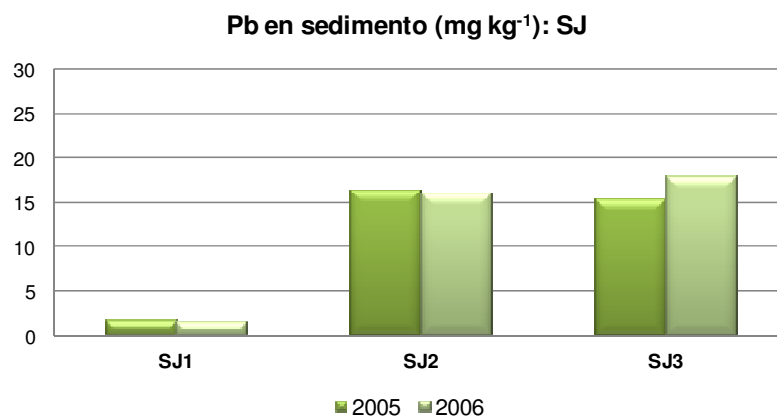


Figura 1.24: Concentraciones de Cu en sedimento (mg kg<sup>-1</sup>), en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), en ambos períodos de muestreo.

**Plomo:** se observa (Fig. 1.25) un patrón semejante a los demás metales en cuanto a las mayores concentraciones del metal en SJ2 y SJ3. Los valores en el 1° muestreo oscilaron entre 1,7 y 16,4 mg kg<sup>-1</sup> Pb, y en el 2° muestreo entre 1,6 y 18 mg kg<sup>-1</sup> Pb.



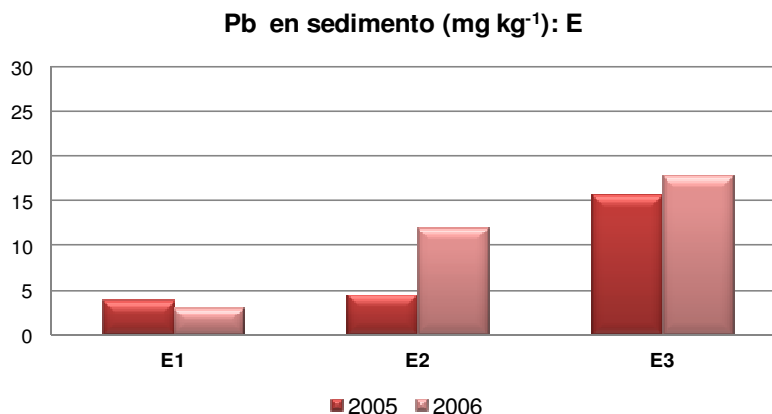


Figura 1.25: Concentraciones de Pb en sedimento ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), en ambos períodos de muestreo.

En la Fig. 1.26, se representa el biplot de la aplicación del Análisis de Componentes Principales (ACP), donde se observa el ordenamiento de las estaciones de muestreo en relación a los parámetros ambientales más representativos. Los dos primeros ejes explicaron el 61,6 % de la variabilidad de los datos ambientales (autovalores: eje I: 7,6 y eje II: 2,8). Este análisis ordenó las estaciones según un gradiente desde las estaciones del cauce principal (a la derecha del gráfico) hacia las estaciones de la llanura de inundación. Las estaciones del cauce principal asociadas a los mayores valores de conductividad, profundidad, dureza, pH, OD y porcentaje de arena (todas estas variables explicadas mediante el eje I, altamente correlacionadas entre sí). El eje II explica a la E1-05, con las mayores concentraciones de Cu y Pb y mayor temperatura en agua. Hacia el otro extremo del gradiente, se encuentran las estaciones de la llanura de inundación, con mayores porcentajes de materia orgánica, arcilla y mayores concentraciones de metales en sedimento (variables explicadas por el eje I). El eje II a su vez, explica la asociación de dichas estaciones con las altas concentraciones de Cr en agua.

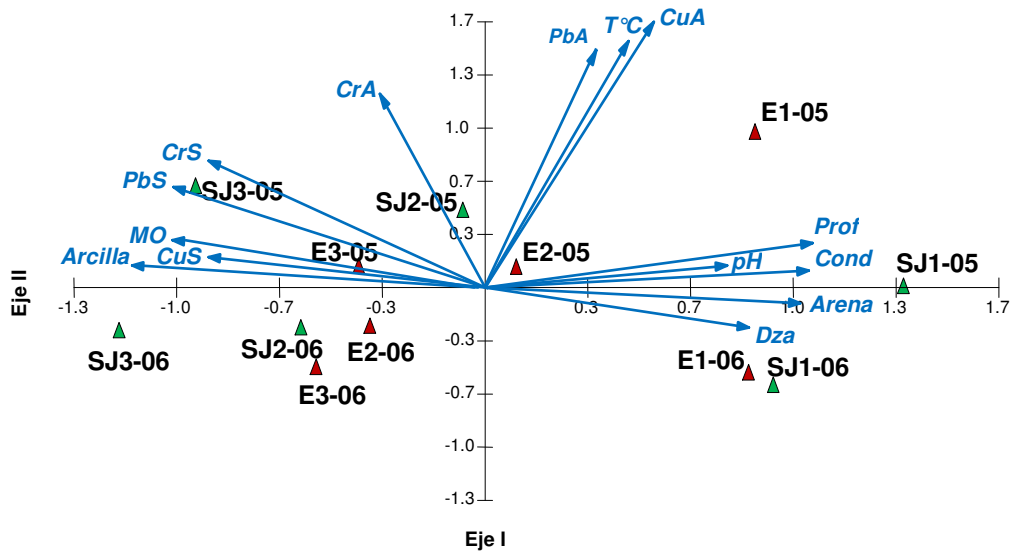


Figura 1.26: Ordenación de las estaciones de muestreo de acuerdo a las variables físicas y químicas aplicando el Análisis de Componentes Principales (ACP). Prof: profundidad; Cond: conductividad; T°C: temperatura; Dza: dureza; CrA: Cr total en agua; CuA: Cu en agua, PbA: Pb en agua; CrS, Cr total en sedimento; CuS: Cu en sedimento; PbS: Pb en sedimento; MO: materia orgánica. Ambos períodos se representan como: -05 (correspondiente a 2005) y -06 (correspondiente a 2006), los cuales se expresan también en las siguientes figuras.

En la Tabla 1.1, se presenta la matriz de de correlaciones de Spearman, para las variables físicas y químicas en todas las estaciones de muestreo estudiadas. Algunas ya fueron representadas por el análisis del ACP, como las correlaciones significativas entre los metales en agua y la temperatura, o entre los metales en sedimento con la materia orgánica y la arcilla. Con este análisis se encontraron además, correlaciones significativas no sólo entre el Cu y Pb, sino también con el Cr, tanto en agua como en sedimento, es decir todos los metales están significativamente correlacionados entre sí, en ambos compartimentos.

	T°C	Cond	pH	Dza	OD	DBO	CrA	CuA	PbA	CrS	CuS	PbS	MO	arena	arcilla
T°C	1														
Cond	0,38	1													
pH	0,39	<b>0,74</b>	1												
Dza	0,24	<b>0,65</b>	0,31	1											
OD	0,22	0,52	0,55	0,15	1										
DBO	0,55	-0,17	-0,22	0,13	-0,31	1									
CrA	<b>0,66</b>	0,32	0,08	0,29	0,21	0,46	1								
CuA	<b>0,81</b>	0,56	0,25	0,58	0,16	0,55	<b>0,81</b>	1							
PbA	<b>0,72</b>	0,24	-0,07	0,38	-0,12	<b>0,7</b>	<b>0,81</b>	<b>0,9</b>	1						
CrS	-0,01	-0,56	<b>-0,69</b>	-0,41	-0,08	0,05	0,02	-0,03	0,18	1					
CuS	-0,21	<b>-0,72</b>	-0,48	-0,57	-0,17	-0,09	-0,46	-0,41	-0,23	<b>0,78</b>	1				
PbS	-0,05	<b>-0,64</b>	<b>-0,66</b>	-0,54	-0,01	0,01	0,17	-0,14	0,08	<b>0,86</b>	<b>0,64</b>	1			
MO	-0,19	<b>-0,65</b>	-0,47	<b>-0,66</b>	-0,16	0,04	0,02	-0,36	-0,12	0,42	0,46	<b>0,75</b>	1		
Arena	0,07	0,46	0,22	0,43	0,12	0,16	-0,03	0,2	0,16	-0,4	-0,45	-0,59	<b>-0,68</b>	1	
Arcilla	-0,19	<b>-0,65</b>	-0,47	<b>-0,66</b>	-0,16	0,04	0,02	-0,36	-0,12	0,42	0,46	<b>0,75</b>	<b>1</b>	<b>-0,68</b>	1

Tabla 1.1: Matriz de correlación (Spearman) para las variables físicas y químicas, en todas las estaciones de muestreo. Las referencias son las mismas que en la tabla anterior. \* Valores en negrita indican correlación significativa ( $p \leq 0,05$ ).

1.4.4. *Concentración de Cr y Cu en moluscos acuáticos: comparación entre humedales*

En la Tabla 1.2, se muestra el rango de las concentraciones de ambos metales analizados para cada sitio de muestreo y compartimento.

Metal	Sitio	Agua (mg l <sup>-1</sup> )	Hepatopáncreas (mg kg <sup>-1</sup> )
<b>Cr</b>	S	0,005-0,006	1,00-2,38
	M	≤ 0,005	≤ 1,00
	C	≤ 0,005	≤ 1,00
<b>Cu</b>	S	0,005-0,01	37,5-71,6
	M	≤ 0,005	10,6-37,4
	C	0,009-0,014	26,8-34,1

Tabla 1.2: Rango de concentraciones de Cr y Cu total en agua (mg l<sup>-1</sup>), y en hepatopáncreas (mg kg<sup>-1</sup>) de *P. canaliculata* en cada sitio de muestreo. S: humedal del río Salado, M: humedal del río Miní, C: humedal del río Coronda. N: 3, en cada ambiente.

De ambos metales analizados en hepatopáncreas, se registraron en todos los humedales, mayores concentraciones de Cu. En cuanto al Cr, en la mayoría de las muestras de todos los humedales se registraron concentraciones ≤ 1 mg kg<sup>-1</sup> Cr, a excepción del valor máximo registrado en el humedal del río Salado, que alcanzó 2,38 mg kg<sup>-1</sup> Cr. En cuanto a las concentraciones en agua, en la mayoría de los humedales fue ≤ 0,005 mg l<sup>-1</sup> Cr.

El Cu, por otra parte se registró en altas concentraciones en los hepatopáncreas, siendo mayores en el río Salado, alcanzando un máximo de 71,6 mg kg<sup>-1</sup> Cu, sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre los sitios (p: 0, 201). Mientras que en el agua, las mayores concentraciones fueron registradas en el humedal del río Coronda, seguido del Salado y Miní.

1.4.5. *Análisis cuali y cuantitativo de los macroinvertebrados bentónicos*

*-Estructura del bentos*

**Densidad**

La densidad promedio varió entre 10 ind.m<sup>-2</sup> (SJ1 y E1-2005) y 5382 ind.m<sup>-2</sup> (SJ3-2005) obteniéndose en general mayores densidades en las estaciones de la zona de referencia y en las de la llanura de inundación (Fig. 1.27).

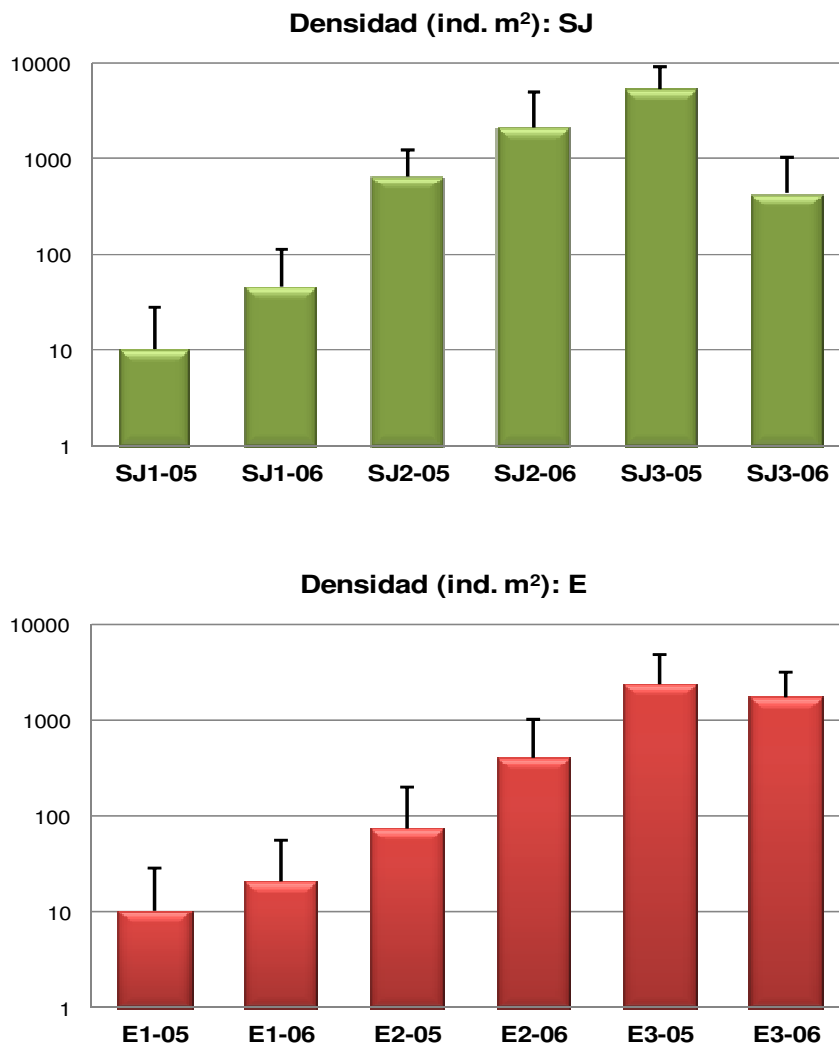


Figura 1.27: Densidad promedio (media ± SD) de invertebrados bentónicos (ind.m<sup>-2</sup>) en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), en ambos períodos de muestreo.

De la aplicación del ANOVA de dos vías a la densidad de organismos entre estaciones y fechas de muestreo (año) se obtuvieron diferencias significativas entre las

estaciones ( $p: 0,000$ ) y entre los años ( $p: 0,038$ ), como también en la interacción estaciones/años ( $p: 0,000$ ). El test de LSD-Fisher (Tabla 1.3, en Anexo), mostró claramente que la densidad de la estación de SJ3-05 se diferenció significativamente de todas las restantes estaciones/años, debido a que obtuvo la máxima densidad registrada en todo el estudio. En cuanto al resto de las estaciones, mostró diferencias significativas en una misma estación entre ambas fechas de muestreo, como es el caso de SJ1, SJ3 y E2. También encontramos diferencias significativas entre las estaciones del cauce principal con las estaciones de la llanura de inundación de la misma zona (SJ1 con SJ2 y SJ3, y por otro lado E1 con E2 y E3), como así también entre las estaciones de la llanura de la misma zona (SJ2-ambas fechas con SJ3-05, E2-05 con E3-ambas fechas). En relación a diferencias significativas entre la zona de referencia con la zona problema, en ambas estaciones del cauce principal, solo hubo diferencias significativas entre SJ1-06 con E1-05. Mientras que predominaron las diferencias significativas entre las estaciones del cauce principal con las de la llanura de inundación entre ambas zonas y fechas de muestreo, como también entre las estaciones de la llanura entre ambas zonas y fechas.

Por otro lado, se aplicó también la distancia euclidiana a la densidad de los taxa según las estaciones/años y este análisis permitió representar las agrupaciones (UPGMA) entre las estaciones con semejantes densidades de organismos (Fig. 1.28). Se observa como SJ3-05 (estación donde se obtuvo la máxima densidad) se diferencia de las otras estaciones por la mayor distancia y se une a las estaciones de la llanura de inundación según un gradiente de densidad (desde E3-06 hasta E2-05). Luego se agrupan las estaciones del cauce principal donde se obtuvieron las densidades más bajas.

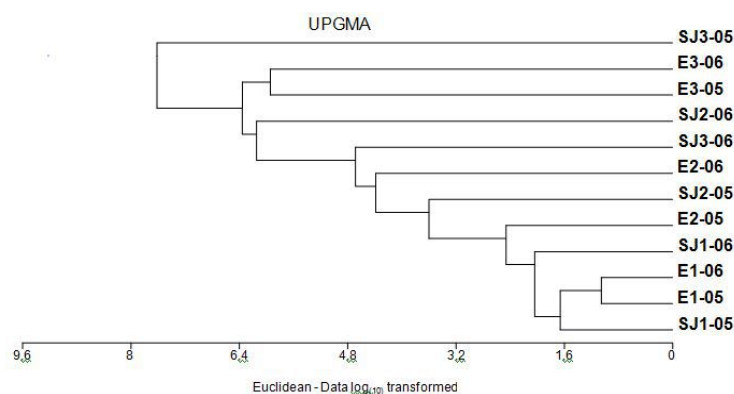


Figura 1.28: Distancia euclidiana según las densidades de invertebrados bentónicos en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), en ambos períodos de muestreo.

La figura 1.29 muestra las abundancias relativas de los taxa bentónicos más representativos por estación y fecha de muestreo. En general podemos observar que los Nematoda Mermithidae estuvieron representados en la mayoría de las estaciones analizadas, alcanzando altas densidades en las estaciones de referencia (a excepción de SJ1-05 y SJ3-06). Los oligoquetos por otra parte, alcanzaron las mayores densidades y así representaron a las estaciones de la llanura de inundación en la zona problema y a la estación SJ3-06.

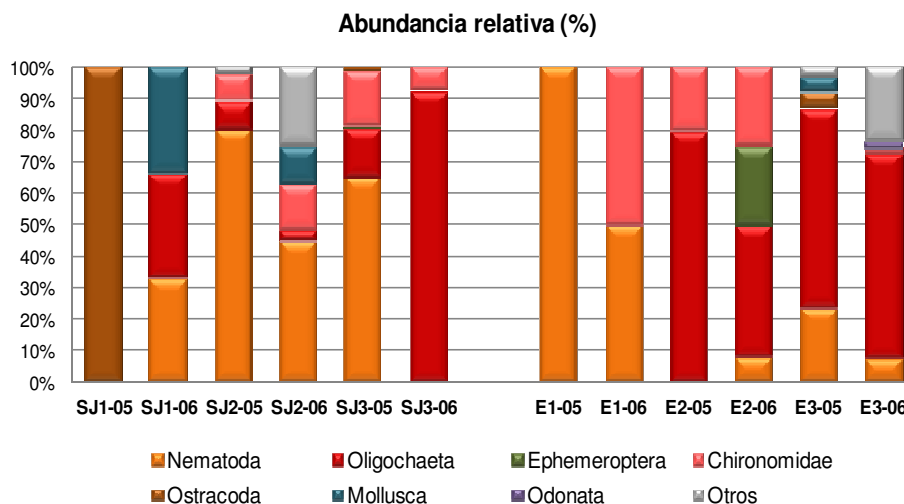


Figura 1.29: Porcentajes de las abundancias relativas de los grupos de invertebrados bentónicos representativos por cada estación y fecha de muestreo.

El detalle de la composición taxonómica con sus abundancias por estación y año se muestra en la Tabla 1.4. En la estación **SJ1** se registraron bajas densidades de organismos (<99 ind.m<sup>-2</sup>), siendo representada en el 1° muestreo únicamente por los Ostracoda, mientras que en el 2° muestreo abundaron los nemátodos (Mermithidae), el oligoqueto *Dero (Dero) nivea* y moluscos Sphaeriidae. En **SJ2**, se registraron mayores densidades, dominando en ambos muestreos los nemátodos (alcanzando hasta 953 ind.m<sup>-2</sup>). Por otro lado, los oligoquetos estuvieron más representados en el 2005, con Enchytraeidae, Naididae (*Pristina jenkiniae* y *Bothrioneurum americanum*), además del díptero *Chironomus* gr. *decorus*. Mientras que en el 2006 solo se registró al oligoqueto *Aulodrilus pigueti* y abundaron los dípteros, como Chironomidae (*Coelotanypus* sp.), Ceratopogonidae y moluscos Planorbidae. En **SJ3**, las densidades fueron muy diferentes entre ambos muestreos. Como fue mencionado anteriormente, en el 2005 se registró la mayor densidad de organismos, dominando los nemátodos (3520 ind.m<sup>-2</sup>), seguidos por



los quironómidos, con *Chironomus* gr. *decorus* (894 ind.m<sup>-2</sup>) y oligoquetos, siendo los más abundantes entre ellos, *Dero* (*Dero*) *multibranchiata*, *D. (Aulophorus) furcatus* y *D. (A.) vagus* (alcanzando 205 ind.m<sup>-2</sup>). Mientras que en el 2006 abundaron los oligoquetos, con las mayores densidades dadas por *Limnodrilus hoffmeisteri* (200 ind.m<sup>-2</sup>).

En cuanto a las estaciones de la zona considerada problema, en **E1** también al igual que en SJ1 se registraron bajas densidades de organismos (<99 ind.m<sup>-2</sup>), con nemátodos en ambos muestreos y la presencia del quironómido *C. gr. decorus* en el 2006. En la **E2** se registraron bajas densidades, sobre todo en el 1° muestreo, representado por el oligoqueto *A. piqueti* y en menor densidad por el quironómido *C. gr. decorus*. Mientras que en el 2° muestreo abundaron los oligoquetos, dominando *D. (D.) nivea* (100 ind.m<sup>-2</sup>) y el efemeróptero *Campsurus sp.* (100 ind.m<sup>-2</sup>), también se registraron quironómidos en menores densidades (*C. gr. decorus* y *Ablabesmyia gr. annulata*). Por otra parte, en **E3** se registraron altas densidades, siendo en el 1° muestreo la mayor densidad total de todo el estudio luego de SJ3 (2005). En general en ambos muestreos las mayores densidades fueron dadas por el oligoqueto *B. americanum* (alcanzando 1437 ind.m<sup>-2</sup>), seguido de nemátodos, hirudíneos, ostrácodos en 2005 y dípteros Ephydriidae en 2006.

Taxa	Cód.	Estaciones según fechas de muestreo											GFT	
		SJ1-05	SJ1-06	SJ2-05	SJ2-06	SJ3-05	SJ3-06	E1-05	E1-06	E2-05	E2-06	E3-05		E3-06
PLATYHELMINTHA														
Turbellaria												*	D	
NEMATODA														
Mermithidae I	Me		*	**	**	***		*	*		*	**	**	D
ANNELIDA														
Enchytraeidae I				*										C
<i>Pristina jenkiniae</i>				*										C
<i>P. leidyi</i>	Pl					*						*		C
<i>Dero nivea</i>	Dn		*			*	*				**			C
<i>D. obtusa</i>	Do					*	*				*	*	*	C
<i>D. evelinae</i>						*								C
<i>D. multibranchiata</i>	Dm					**								C
<i>D. (Aulophorus) furcatus</i>	Df					**								C
<i>D. (A.) vagus</i>	Dv					**								C
<i>D. botrytis</i>								*						C
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	Lh					*	**				*			C
<i>L. udekemianus</i>	Lu											*		C
<i>Aulodrilus pigueti</i>	Ap				*					*				C
<i>Bothrioneurum americanum</i>	Ba			*		*	*					***	***	C
<i>Paranadrilus descolei</i>						*								C
Megadrili I												*		C
Hirudinea I	Hi											*	**	D
EPHEMEROPTERA														
<i>Baetis</i> sp.						*								C
<i>Campsurus</i> sp.	Cam										**			C
ODONATA														
Coenagrionidae I													*	D
DIPTERA														
Tipulidae														
<i>Monopelopia</i> sp.						*								D
<i>Zavrelimyia</i> sp.						*								D
<i>Coelotanyus</i> sp.	Cos				**									D
<i>Ablabesmyia</i> gr. <i>annulata</i>											*			D
<i>Djalmabatista</i> sp2.							*							D
<i>Chironomus</i> gr. <i>decorus</i>	Chd			*		**		*	*	*				C
<i>Dicrotendipes</i> sp.1						*								C
<i>Dicrotendipes</i> sp.3													*	C
Ceratopogonidae I	Cer				**									D
Stratiomyidae I					*									C
<i>Chaoborus</i> sp.											*			D
Ephydriidae I	Ep												**	C
CRUSTACEA														
Ostracoda I	Os	*				*						**		C
<i>Hyalella curvispina</i>	Hc				*	*							*	C
MOLLUSCA														
Planorbidae I	Pla				**							*		R
<i>Pomacea canaliculata</i>	Pc											*		R
Sphaeriidae I			*									*		F
Ancylidae I					*									R

Tabla 1.4: Composición taxonómica, abundancias y asignación de los grupos funcionales tróficos (GFT) del bentos registrados en cada estación y fecha de

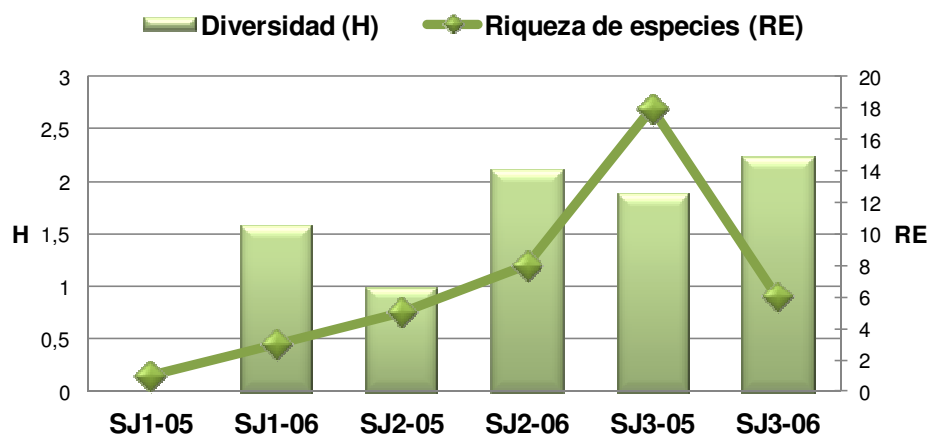
muestreo.\* indica: <99 ind.m<sup>-2</sup>, \*\* indica: 100-999 ind.m<sup>-2</sup> y \*\*\* indica: >1000 ind.m<sup>-2</sup>.  
C: colectores, D: depredadores, F: filtradores y R: raspadores. Cód.: códigos.

### Riqueza, diversidad y equitatividad de unidades taxonómicas

Se registró un total de 41 taxa en toda el área de estudio, de los cuales 16 se reconocieron a nivel específico y el resto a diferentes niveles taxonómicos (Tabla 1.4).

La diversidad alfa, beta y gama en la zona de referencia fue 6,8; 64,9% y 29 especies, mientras que en la zona problema: 5,6; 64,8 % y 24 especies, respectivamente. Por lo tanto solo la diversidad  $\alpha$  y  $\gamma$  fueron mayores en la zona de referencia, mientras que la  $\beta$  fue semejante, indicando que casi 65% de las especies se reemplazan entre las estaciones de la transecta de cada zona.

La riqueza (RE) y diversidad (H) de especies (Fig. 1.30) fueron al igual que las densidades, mayores en las estaciones de la llanura de inundación de ambas zonas y menores en las estaciones del cauce. La RE en SJ varió entre 1 (SJ1-05) a 18 unidades taxonómicas (SJ3-05), siendo este último valor, el máximo registrado en todo el estudio, el cual coincide con el máximo valor de densidad total en dicha estación. Mientras que en E la RE varió entre 1 (E1-05) a 12 unidades taxonómicas (E3-05). Como se observa, tanto en SJ como en E, los mayores valores de RE fueron registrados en la estación 3 en el 1° muestreo. Por otra parte, la diversidad en SJ varió entre 0 (SJ1-05) a 2,23 (SJ3-06), mientras que en E entre 0 (E1-05) a 2,63 (E2-06). La equitatividad, varió en SJ entre 0 (SJ1-05) y 1 (SJ1-06), y lo mismo en E, entre 0 (E1-05) y 1 (E1-06).



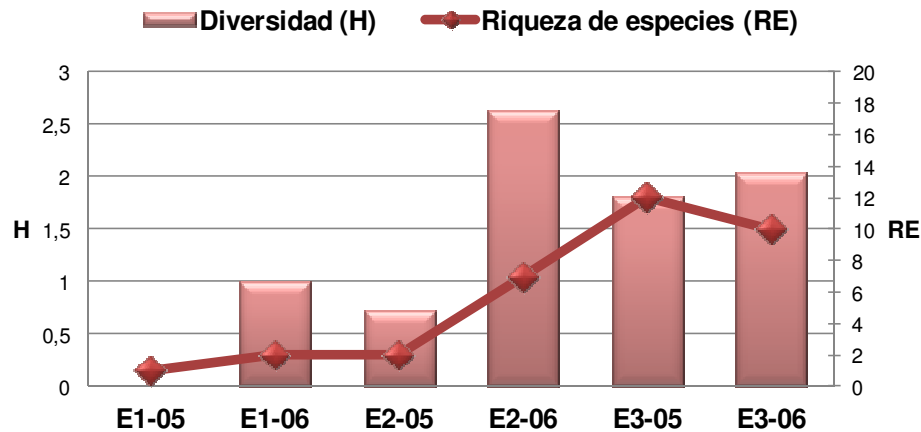


Figura 1.30: Riqueza (RE) y Diversidad (H) específica de invertebrados bentónicos en las estaciones de la zona de referencia (SJ) y problema (E), en ambos períodos de muestreo.

De la aplicación del ANOVA de dos vías a las riquezas de especies por estación y año, se obtuvieron diferencias significativas entre las estaciones ( $p: 0,000$ ) pero no entre los años ( $p: 0,888$ ), mientras que también se encontraron diferencias significativas en la interacción estaciones/años ( $p: 0,010$ ). En el test de LSD-Fisher (Tabla 1.5, en Anexo) se obtuvieron diferencias significativas entre las estaciones en su mayoría de la llanura de inundación con las del cauce principal, de ambas zonas. Estas últimas, presentaron las menores riquezas, junto a E2-05 y no se diferenciaron significativamente entre sí. Por su parte, las estaciones de la llanura de inundación que mostraron las mayores riquezas y tampoco se diferenciaron entre sí, fueron: SJ3-05, SJ2-06 y E3 (ambas fechas).

De la aplicación del Análisis de Correspondencia (DCA), los dos primeros ejes explicaron el 38% de los datos (autovalores: eje I: 0,47 y eje II: 0,21). En la Fig. 1.31, se presenta la gráfica resultante, en la cual se observan relaciones entre estaciones de muestreo y ensambles de taxa, pero no un gradiente de contaminación como se esperaba. Así la estación E1-05 con el único taxa registrado, nemátodos Mermithidae. La estación E3-06 con Ephydridae, *B. americanum*, *Hyalella curvispina* e Hirudinea. La estación E2-06 y SJ3-06 con *L. hoffmeisteri*, *D. (D) nivea*, *D. (D) obtusa* y *Campsurus* sp. La estación SJ2-06 se relaciona principalmente con Ceratopogonidae, *Coelotanypus* sp., *A. pigueti* y Planorbidae y SJ3-05 con *C. gr. decorus*, *D. (D) multibranchiata*, *D. (A)*

*furcatus* y *D. (A) vagus*. Los atributos, densidad total y riqueza específica se relacionan fundamentalmente con las estaciones 2 y 3 de ambas zonas.

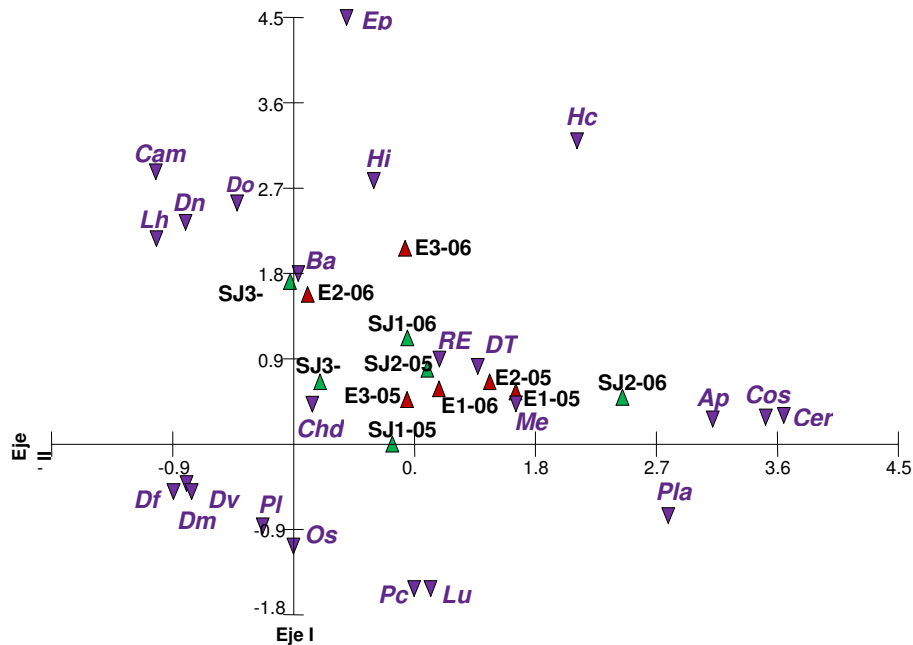


Figura 1.31: Ordenación de las estaciones de muestreo de acuerdo a la densidad de los taxa y atributos bentónicos aplicando el Análisis de Correspondencia Detendenciado (DCA). Los códigos están expresados en la tabla 1.4, a excepción de la DT: densidad total y RE: riqueza específica.

Por otro lado, se hicieron correlaciones de Spearman (Tabla 1.6), entre las variables físicas y químicas PI con la densidad total y riqueza de especies, como también entre dichos atributos. Los resultados, demostraron que tanto la densidad como la riqueza de especies están correlacionadas negativamente con la conductividad y pH. También, se encontraron correlaciones significativamente positivas entre la materia orgánica y la arcilla con ambas variables biológicas. En cuanto a los metales, el PbS se correlacionó positivamente con ambas variables biológicas, y el CrS con la densidad. Por último ambas variables biológicas se correlacionaron positivamente entre sí.

	T°C	Cond	pH	Dza	OD	DBO	CrA	CuA	PbA	CrS	CuS	PbS	MO	Arena	Arcilla	DT	RE
DT	-0,27	<b>-0,76</b>	<b>-0,73</b>	-0,53	-0,2	0,07	0,13	-0,32	-0,04	<b>0,61</b>	0,4	<b>0,8</b>	<b>0,65</b>	-0,47	<b>0,65</b>	1	
RE	-0,39	<b>-0,79</b>	<b>-0,62</b>	-0,6	-0,13	-0,01	-0,01	-0,5	-0,22	0,47	0,41	<b>0,71</b>	<b>0,65</b>	-0,38	<b>0,65</b>	<b>0,95</b>	1

Tabla 1.6: Matriz de correlación (Spearman) para las variables físicas, químicas y biológicas en todas las estaciones de muestreo. Las referencias son las mismas que en la Tabla 1.1 y Figura 1.31. \* Valores en negrita indican correlación significativa ( $p \leq 0.05$ ).

**-Grupos funcionales tróficos (GFT)**

La lista de organismos según su posición trófica se muestra en la Tabla 1.4 y la gráfica resultante por estación y fecha de muestreo se observa en la figura 1.32. En general en ambas zonas, tanto de referencia como problema se encontraron dos grupos dominantes: los colectores de detritus y los depredadores, ambos característicos del sistema del río Paraná, siendo los primeros más abundantes en las estaciones de la llanura de E y los segundos en la llanura de SJ.

**San Justo:** en el cauce (SJ1) se encontraron diferencias entre ambos muestreos, en el 1° dominaron los colectores (Ostracoda, único grupo), mientras que en el 2° muestreo encontramos las mismas proporciones de colectores (Oligochaeta en este caso), depredadores (Nematoda) y filtradores (moluscos Sphaeriidae). Por otra parte, en SJ2, dominaron los depredadores (mayormente Nematoda, luego Ceratopogonidae y quironómidos Tanypodinae). Dentro de los colectores, encontramos Oligochaeta y Chironomidae, mientras que los raspadores obtenidos fueron moluscos Planorbidae. En SJ3, dominaron en el 1° muestreo los depredadores (mayormente Nematoda) y el resto fueron colectores (Chironomidae y Oligochaeta). Mientras que en el 2° muestreo los colectores fueron dominantes (Oligochaeta), y los depredadores fueron quironómidos Tanypodinae.

**Esperanza:** también se encontraron diferencias entre ambos muestreos en el cauce (E1), con dominancia de los depredadores (Nematoda, único grupo) en el 1° muestreo, mientras que en el 2° la co-dominancia con los colectores (Chironomidae). Por otra parte, en ambas estaciones de la llanura de inundación dominaron los colectores. En E2 estuvieron representados por Oligochaeta, Chironomidae y Ephemeroptera (en el 2° muestreo). Los depredadores encontrados fueron Nematoda y quironómidos Tanypodinae. Mientras que en la E3, si bien los colectores dominantes también fueron los Oligochaeta, se encontraron además en menor abundancia dípteros Ephydriidae y crustáceos Ostracoda. Dentro de los depredadores, además de Nematoda, se encontraron Hirudinea y raspadores representados por Mollusca.

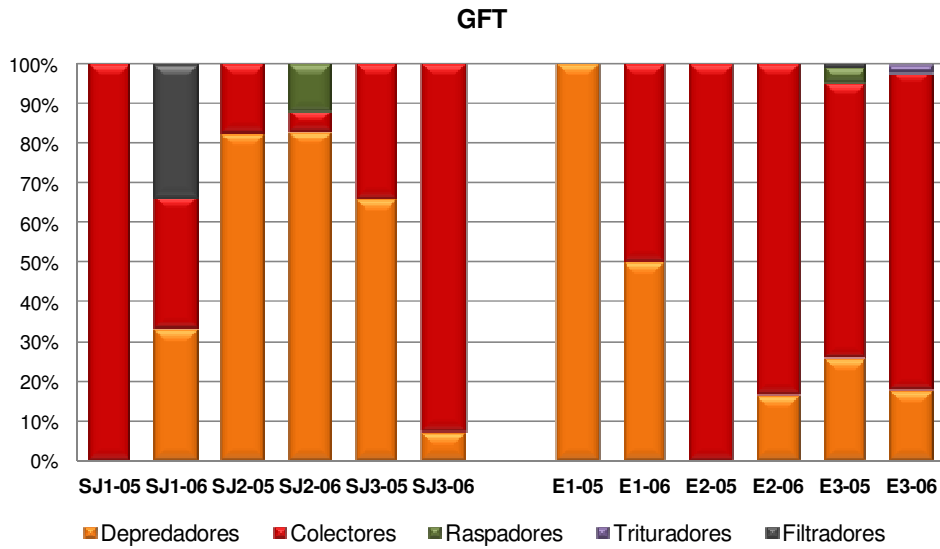


Figura 1.32: Porcentajes de las abundancias relativas de los grupos funcionales tróficos (GFT) de invertebrados bentónicos representativos por cada estación y fecha de muestreo.



**-Índices bióticos**

Según el índice **IBMWP** (Fig. 1.33), en SJ se obtuvo un bajo valor en el cauce, el cual correspondería a la clase V (<16) de calidad de agua, lo que indica “aguas fuertemente contaminadas”, mientras que en la llanura, se obtuvo el mismo valor en ambas estaciones (19,5), correspondiendo a la clase IV (16-35), indicando “aguas muy contaminadas”. En E, se obtuvo también un bajo valor tanto en el cauce como en E2, correspondiendo ambas a la clase V, al igual que SJ1, mientras que en E3 aumentó (30), perteneciendo a la clase IV como SJ-llanura. Si tomamos en cuenta el promedio para cada zona (Tabla 1.7) ambas (SJ y E) quedarían comprendidas en la clase V, por lo que no habría diferencias entre ellas, ya que ambas estarían “fuertemente contaminadas”.

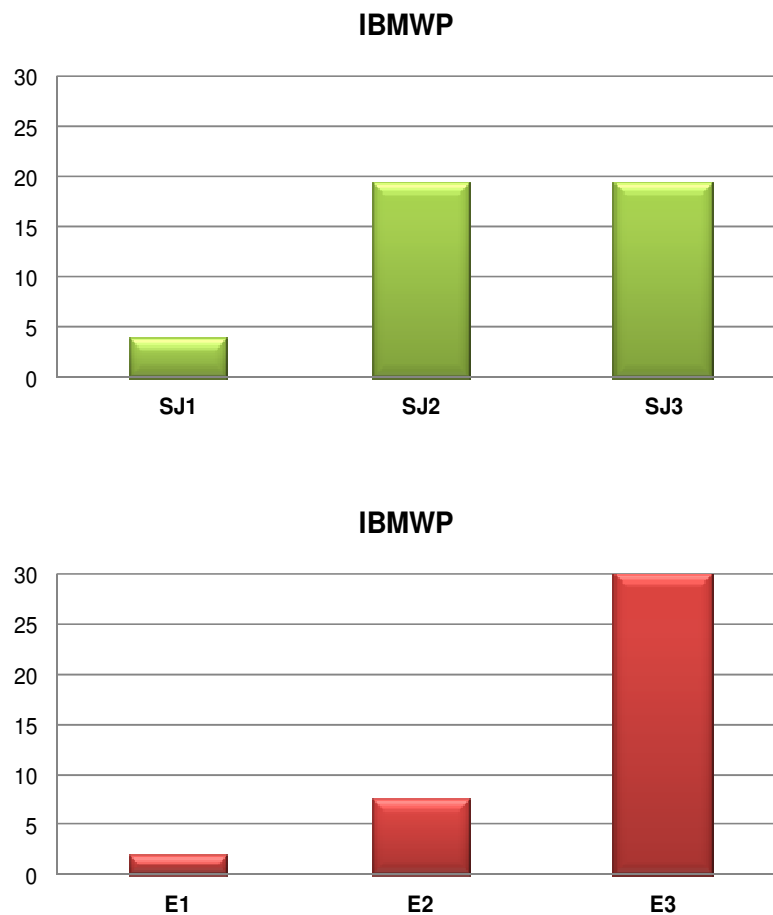


Figura 1.33: Promedio del índice Iberic Biological Monitoring Working Party (IBMWP), obtenido según los invertebrados bentónicos, en cada estación de muestreo.

Con el índice **IMRP** (Fig. 1.34), en ambas zonas se obtuvieron puntajes similares y las mismas clasificaciones de calidad de agua. Tanto en SJ1 como E1 se obtuvieron valores entre 0 y 1, lo que indica “contaminación muy fuerte”, en SJ2 y E2 valores entre 1,1-2,5, indicando “contaminación fuerte”, mientras que en SJ3 y E3, valores más altos (entre 2,6 y 3,9) indicando “contaminación moderada”. Sin embargo de la interpretación de los promedios para cada zona (Tabla 1.7), ambas estarían bajo la clasificación de “contaminación fuerte”.

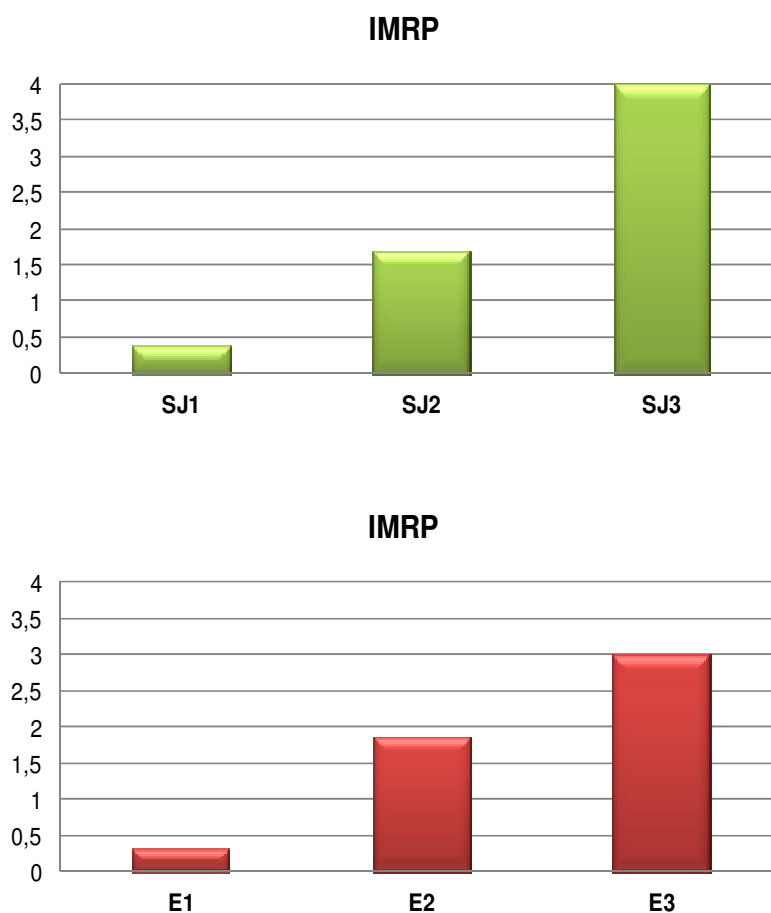


Figura 1.34: Promedio del Índice de Macroinvertebrados para Ríos Pampeanos (IMRP), obtenido según los invertebrados bentónicos, en cada estación.

Con el índice **ASPT** (Fig. 1.35), si bien se obtuvieron mayores valores en SJ, al igual que en los índices precedentes, clasificó a ambas zonas con la misma calidad de agua (valores <4), lo que indicaría “probable polución grave” (Tabla 1.7).

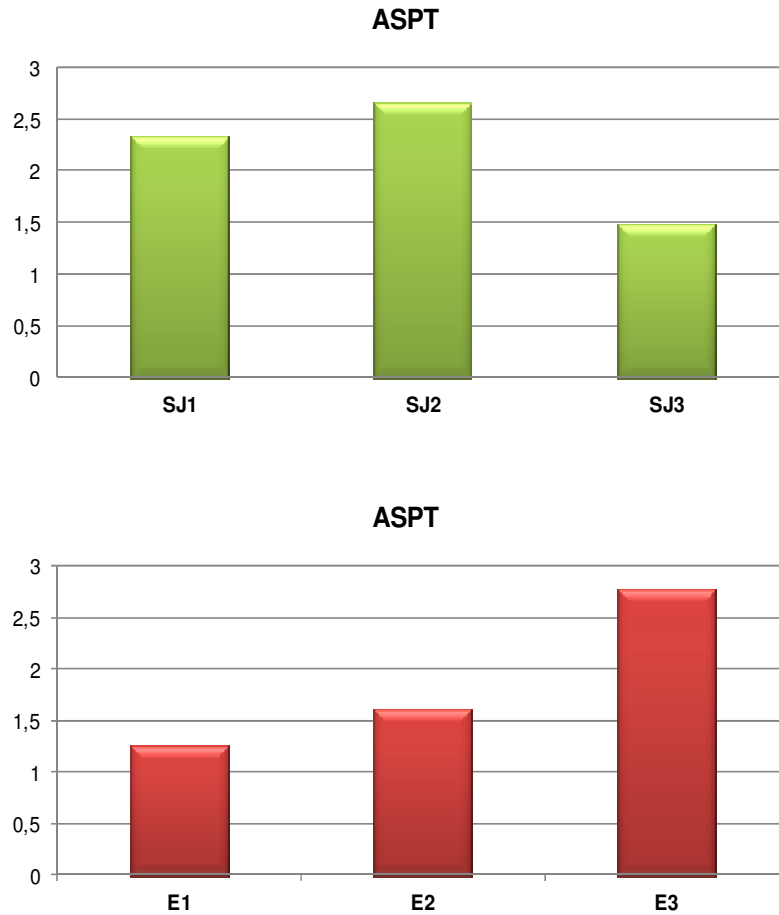
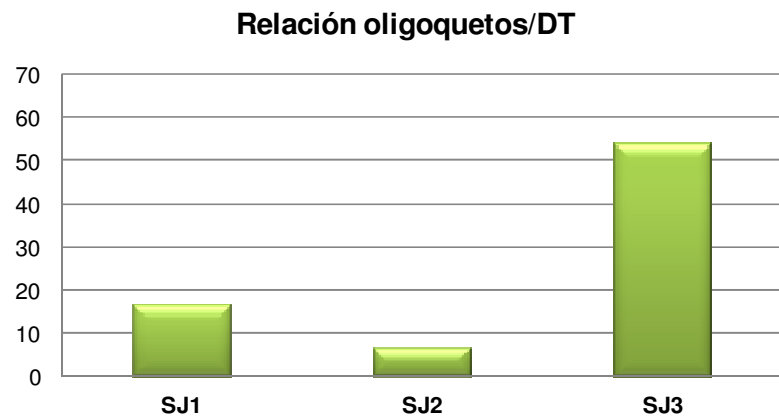


Figura 1.35: Promedio del Índice Average Score Per Taxón (ASPT), obtenido según los invertebrados bentónicos, en cada estación.

De la relación densidad de oligoquetos/DT (Fig. 1.36), se obtuvieron mayores valores en las estaciones de E (a excepción de E1, donde no se registraron), siendo el porcentaje promedio en SJ de 25,7%, mientras que en E de 42,15%.



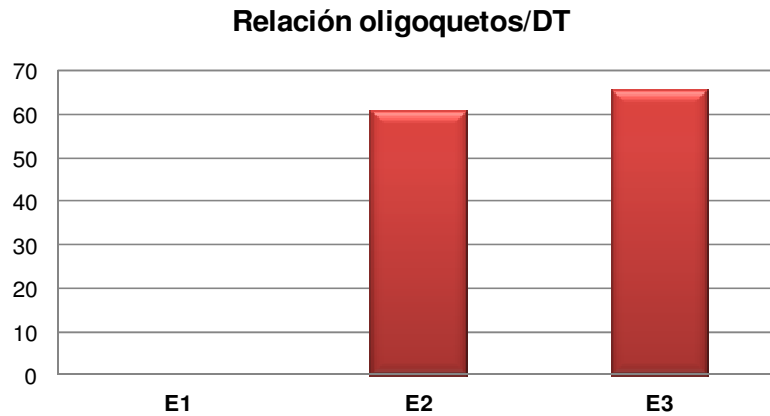


Figura 1.36: Promedio de la relación densidad de oligoquetos/densidad total (DT), obtenido según los invertebrados bentónicos, en cada estación.

Finalmente, de la relación densidad de quironómidos/DT (Fig. 1.37), también en E se obtuvieron los mayores valores (a excepción en este caso de E3), siendo el porcentaje promedio en SJ de 8 %, mientras que en E de 16 %.

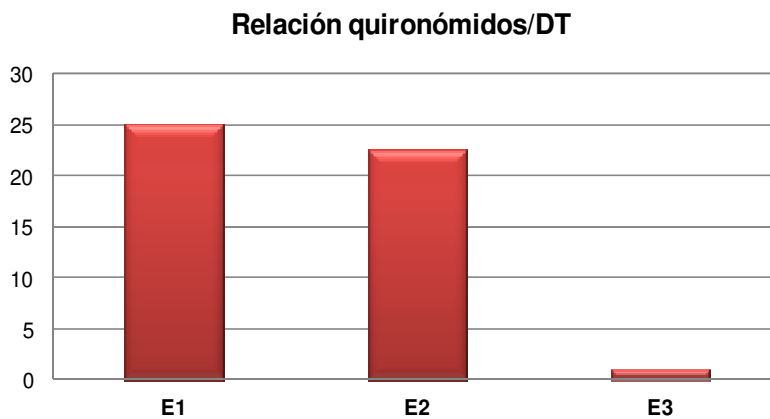
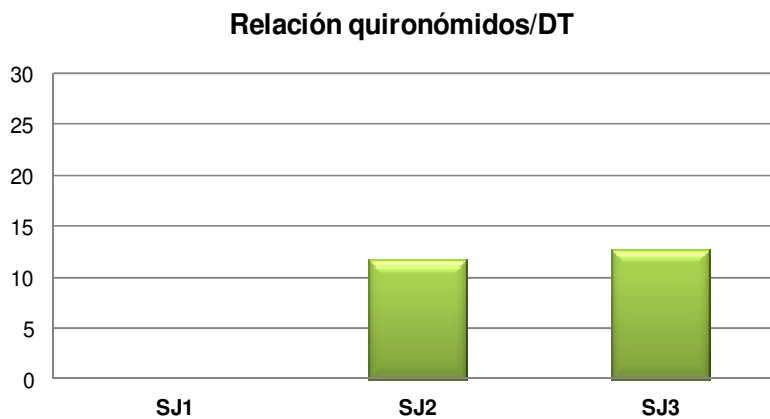


Figura 1.37: Promedio de la relación densidad de quironómidos/densidad total (DT), obtenido según los invertebrados bentónicos, en cada estación.

	H'	IBMWP	ASPT	IMRP	Olig/DT (%)	Quir/DT (%)
<b>SJ</b>	1,47	14,33	2,15	2,34	25,70	8,08
	Contaminación Moderada	Contaminación fuerte	Probable contaminación grave	Contaminación fuerte		
<b>E</b>	1,36	13,17	1,90	1,73	42,16	16,15
	Contaminación Moderada	Contaminación fuerte	Probable contaminación grave	Contaminación fuerte		

Tabla 1.7: Promedio de los índices bióticos aplicados y Clasificación de calidad de agua (con esquema de colores) para ambas zonas (SJ y E). También se anexa la clasificación del índice de Shannon (H') según Wilhm y Dorris (1968).

### 1.5. Discusión

Si bien es ampliamente aceptado que las variables físicas y químicas del hábitat en que viven los macroinvertebrados bentónicos influyen en la estructura y funcionamiento de esta fracción, es difícil establecer en sistemas complejos y poco estables si los cambios producidos son producto de factores naturales o de origen antropogénico, o de ambos. En el río Salado, las variables abióticas definieron una clara diferenciación del estado de calidad del agua entre las estaciones del cauce principal y las de la llanura de inundación.

Así, el cauce principal del río Salado presentó mayor conductividad, profundidad, dureza, pH, OD y porcentajes de arena en el sedimento, que en las estaciones de la llanura, obteniéndose en general mayores valores de estos parámetros en SJ. Mientras que en E, se registraron las mayores concentraciones de metales como Pb y Cu en agua (en el 2005). La alta conductividad y dureza en las estaciones del cauce, son características de este río. En un estudio previo a esta tesis, en los mismos ambientes, se registraron también los mayores valores de conductividad en SJ, tanto en el cauce como en la llanura de inundación, debido a menores precipitaciones durante el periodo estudiado (Marchese *et al.*, 2008a).

En las estaciones de la llanura de inundación, los valores de las variables físicas y químicas difieren, debido a que las precipitaciones tienen mayor incidencia por la menor profundidad, e inclusive en algunos puntos son humedales temporarios. En estas estaciones, se registraron además mayores valores de DBO<sub>5</sub>, nutrientes y Cr en agua. En el sedimento, se registró un mayor contenido de materia orgánica, arcilla y concentraciones de metales. Todos los metales analizados fueron registrados en mayores concentraciones en las estaciones de SJ.

Las concentraciones del OD fueron mayores a 6 mg l<sup>-1</sup>, a excepción de las estaciones de la llanura de inundación en E, en donde se registraron 2 mg l<sup>-1</sup>. Esta situación estaría relacionada a las condiciones naturales de estos ambientes someros, con alto contenido de materia orgánica (se observó además, presencia de ganado vacuno), la cual genera mayor consumo de oxígeno. A su vez, en dichas estaciones, la DBO<sub>5</sub> presentó altos valores, siendo mayores al máximo propuesto por Hellawell (1986), de 7 mg l<sup>-1</sup>, para aguas naturales no contaminadas. Asimismo, las

concentraciones registradas en todo el estudio fueron superiores a las halladas por Marchese *et al.* (2008a), donde no superaron los 3 mg l<sup>-1</sup>, tanto en SJ como E.

En cuanto a los metales, los análisis tanto en agua como en sedimento, reflejaron la contaminación de esta cuenca. En ambas zonas, la concentración de metales en agua fueron mayores a los estándares permitidos tanto en Argentina (Nivel Guía para la Protección de la Biota Acuática-NGPBA, propuesto por la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación Argentina, 2004), como en Canadá (Canadian Water Quality Guidelines-Canadian Environmental Protection Act-CEPA, 2003). Al no existir al momento niveles guía para metales en sedimentos de fondo, se tuvieron en cuenta los niveles guía canadienses. Las concentraciones en sedimento, si bien fueron altas en las estaciones de la llanura de inundación de SJ, fueron menores a los estándares comparados.

Las concentraciones de Cr en agua indican contaminación por este metal, tanto en E como en SJ. En todas las estaciones analizadas, superaron al estándar argentino ( $\leq 0,0025$  mg l<sup>-1</sup> Cr Total) y también en general al canadiense (0,0089 y 0,001 mg l<sup>-1</sup> Cr III y Cr VI, respectivamente), registrándose mayores valores en la llanura. En sedimento, también las mayores concentraciones se obtuvieron en la llanura de ambas zonas, sin embargo, no superaron el nivel guía canadiense (37,3 mg kg<sup>-1</sup> Cr), siendo la mayor concentración alcanzada de 25 mg kg<sup>-1</sup> Cr, en SJ2.

El Cu en agua, superó el estándar argentino (0,0066 mg l<sup>-1</sup> Cu) (a excepción de E3-06) y el canadiense (0,002 a 0,004 mg l<sup>-1</sup> Cu), en todas las estaciones analizadas, indicando también contaminación por este metal en ambas zonas. Sin embargo a diferencia del Cr, en este caso la mayor concentración de Cu fue en el cauce de E. Mientras que en sedimento, presentó el mismo patrón que el Cr, mayores concentraciones en las estaciones de la llanura. No obstante, tampoco fueron superiores al estándar canadiense (35,7 mg kg<sup>-1</sup> Cu), siendo la máxima concentración registrada de 30 mg kg<sup>-1</sup> Cu, también en SJ (SJ3).

El Pb por su parte, en agua superó el estándar argentino (0,0016 mg l<sup>-1</sup> Pb) y el canadiense (0,001 a 0,007 mg l<sup>-1</sup> Pb) en ambas zonas de estudio, alcanzando la máxima concentración también en el cauce de E. En sedimento, presentó el mismo patrón que el

resto de los metales, pero sin superar el estándar canadiense ( $35 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Pb}$ ), siendo el máximo valor de  $18 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Pb}$ , también en SJ (SJ3).

Las mayores concentraciones de los metales registrados en los sedimentos de la llanura de inundación, se podrían relacionar principalmente con las características propias del tipo de sedimento limo-arcilloso y su alto contenido de materia orgánica, que sumado a su menor capacidad de dilución por poseer menores caudales, permite a los sedimentos ser el compartimento donde los tóxicos se depositan y acumulan durante el transcurso del tiempo. En este estudio, se demostró una fuerte relación positiva entre los metales y los componentes de materia orgánica, arcilla y limo. Existen varias investigaciones al respecto, como la de Filion y Morin (2000), quienes analizaron las concentraciones de diversos metales (Cr, Cu y Pb) en sedimentos de ambientes inundables del río St. Lawrence (Canadá) donde, en las estaciones con sedimento arenoso, las concentraciones de metales fueron bajas, mientras que en aquellas con alto contenido de materia orgánica, arcilla y limo, las concentraciones fueron mayores. Consecuentemente, la granulometría de los sedimentos de fondo es clave en la acumulación de metales en los ambientes acuáticos.

Por otro lado, las concentraciones de Cr en agua y sedimento registradas en los mismos ambientes durante el 2002 superaron los niveles guía, pero luego de la inundación de abril del 2003, las concentraciones de Cr disminuyeron notablemente, y se mantuvieron en general por debajo de los estándares (Marchese *et al.*, 2008a). Esto resultó de la re-estructuración físico-química y química post-inundación, debido a la removilización de los sedimentos. Otro estudio, en ambientes de esta misma cuenca en relación al zooplancton, realizado por Gagneten *et al.* (2007), registró también altas concentraciones de los mismos metales estudiados en esta tesis, tanto en agua como en sedimentos, y fueron en general mayores a los estándares permitidos. Sin embargo, las concentraciones fueron menores en SJ (antes de la inundación de 2003).

La presente investigación, realizada 2 años posteriores a los estudios citados, y luego de la inundación extraordinaria aún con la removilización de sedimentos, confirma que el río Salado continúa presentando contaminación por metales. Al respecto, la contaminación por Cr en el río Salado del Norte es histórica (Gagneten, 2008), ya que las distintas curtiembres instaladas en la zona, algunas de las cuales



operan desde el año 1887 en la ciudad de Esperanza, utilizan sales de Cr en sus procesos industriales. A esta situación, se suma la descarga de efluentes con este metal y otros como el Cu y Pb, que son aportados por otras industrias, talleres metalúrgicos, así como por la intensa actividad agrícola de la zona. Esta última, permite la acumulación de metales, debido al lavado de suelos en los que desde hace años se practica el control de plagas en los cultivos, mediante el uso de agroquímicos que contienen arseniato de Pb y sulfato de Cu.

En general se considera que las comunidades sujetas a perturbaciones, responderán con una disminución en los atributos de riqueza, equitatividad y diversidad específica.

Si bien tales atributos en los ensamblajes bentónicos analizados fueron significativamente diferentes entre SJ y E (siendo en esta última menores), las mismas correspondieron principalmente a diferencias entre las estaciones del cauce principal y llanura de inundación, más que entre llanuras o cauces entre sí de ambas zonas. Los resultados obtenidos, revelaron que fue la densidad, el atributo que permitió la principal diferenciación entre SJ y E, siendo mayor en SJ (en la llanura). Sin embargo la mayor densidad, no se debió a mejor calidad del agua, sino a la dominancia de nemátodos.

Marchese *et al.* (2008a), también encontraron las mayores densidades y riquezas de invertebrados bentónicos en las estaciones de la llanura de inundación. Sin embargo, dichos atributos superaron por más del doble a los valores de este estudio, alcanzando la máxima densidad de 11796 ind. m<sup>-2</sup> *versus* 5382 ind. m<sup>-2</sup> y riqueza de 41 especies *versus* 18 especies (SJ). Sin embargo, luego de la inundación y reestructuración ya mencionada, las densidades halladas disminuyeron. En relación al efecto hidrológico de este trabajo, se encontraron diferencias significativas en las densidades de los organismos entre ambas fechas de muestreo. En este sentido, las mayores densidades fueron encontradas siempre en el muestreo de 2006, es decir durante la fase de aguas bajas, para las estaciones 1 y 2 de cada zona, mientras que en la estación 3 de ambas zonas, no se observó dicho patrón. Esto puede relacionarse con la menor influencia del río en esta última estación, ya que es la más alejada. En cuanto a la diversidad específica entre ambas zonas, el índice de Shannon, en promedio, fue ligeramente mayor en SJ (llanura) en ambos estudios. No obstante, los valores dados por Marchese *et al.* (2008a)

fueron muy superiores (siendo registrados luego de la inundación), con un máximo de 4,3 y 4 *versus* 2,2 y 2,6 (en SJ y E, respectivamente).

Por otro lado, los análisis de correlaciones demostraron que tanto la densidad como la riqueza específica están correlacionadas positivamente entre sí y a su vez, con la materia orgánica y la arcilla. Mientras, que ambas, se correlacionaron negativamente con la conductividad y pH. Estas variables ambientales tienen una importante influencia sobre la distribución de los invertebrados bentónicos, determinando menores densidades y riquezas específicas en las estaciones del cauce, y mayores en las estaciones de la llanura de inundación. Otra relación importante se registró con los metales. En agua, ninguno de ellos se correlacionó significativamente con las variables biológicas, mientras que, los metales en sedimento como el PbS, se correlacionó positivamente con ambas variables biológicas, y el CrS con la densidad. Esta relación positiva entre metales con el sedimento y atributos biológicos podría explicarse principalmente por las especies dominantes, tales como nemátodos y algunas especies de oligoquetos que presentan una mayor tolerancia a metales, utilizando distintos mecanismos de detoxificación (Klerks y Bartolomew, 1991; Vatamaniuk *et al.*, 2001).

En relación a la clasificación de calidad de agua, según el índice de diversidad de Shannon por Wilhm y Dorris (1968), no proporcionó diferencias, ya que en ambas zonas en promedio se obtuvieron valores entre 1 y 3, lo que significaría “agua moderadamente contaminada”. Sin embargo, si bien dicho resultado es coherente debido la presencia de metales en ambas zonas, semejantes resultados fueron registrados por Marchese y Ezcurra de Drago (1983), en tributarios y cauces secundarios menores, no contaminados del río Paraná Medio. De esta manera, valores menores a 1 que indican contaminación severa, son los comúnmente encontrados en el centro del río Paraná por las características físicas rigurosas del ambiente (lecho móvil arenoso) y no por contaminación (Marchese y Ezcurra de Drago, 1992; 1999). Por lo expuesto, la utilización de este parámetro no contribuye para discriminar la calidad de los ambientes en este estudio. Si bien los análisis de riqueza y diversidad específica, son simples al momento de aplicarlos, y permiten rápidos resultados, tienen la gran desventaja que suelen no ser sensibles a todo tipo de perturbaciones y/o características naturales de los ambientes acuáticos. En el caso de contaminación por tóxicos, como metales pesados, en donde puede existir un reemplazo de especies intolerantes por otras tolerantes a las

condiciones del ambiente, esto no suele ser reflejado en el número de especies, ya que pueden igualarse en número. Además la sola aplicación de este índice en grandes ríos con llanura aluvial, no permite la determinación de calidad de agua, debido a que las características del lecho móvil, con sedimento de fondo arenoso, poco contenido de materia orgánica, alta velocidad de la corriente, lo hacen un hábitat muy riguroso para la colonización y desarrollo de alta diversidad de taxa, independientemente de los contaminantes.

Por lo tanto, la información de los taxa que componen los ensambles, como su grado de sensibilidad o tolerancia es de gran importancia para determinar la calidad de los ambientes. De esta manera, se pudo establecer una diferenciación de ensambles de macroinvertebrados bentónicos para cada ambiente, que contribuyó a completar el diagnóstico de la calidad del agua.

Los taxa dominantes en la llanura de inundación de SJ, fueron: Mermithidae I, *C. gr. decorus*, Ceratopogonidae, *Coelotanypus* sp., *L. hoffmeisteri*, Planorbidae I, *D. (D.) multibranchiata*, *D. (A.) furcatus* y *D. (A.) vagus*. Mientras que en el cauce principal, el ensamble estuvo formado por Ostracoda I, Mermithidae I, *D. (D.) nivea* y Sphaeriidae.

En la llanura de inundación de E: *B. americanum*, Mermithidae I, Ephydriidae I, Ostracoda I, *D. (D.) nivea*, Hirudinae I y *Campsurus* sp. Mientras que en el cauce principal, Mermithidae I y *C. gr. decorus*.

En la llanura de SJ, los nemátodos dominaron, registrándose en la mayoría de las estaciones. Luego fueron los quironómidos y oligoquetos los taxa más representativos. Mientras que en la llanura de E, fueron los oligoquetos, y el ensamble bentónico estuvo más simplificado en relación a SJ. Por su parte, en el cauce principal de ambas zonas, los ensambles fueron extremadamente simples, debido a las características del lecho del cauce que lo hacen sumamente riguroso para su colonización.

Estudios previos en ambientes de la cuenca analizada (Marchese y Ezcurra de Drago, 1999; Zilli y Gagneten, 2005; Marchese *et al.*, 2008a) con alto contenido de metales en sedimentos (antes de la inundación extraordinaria del 2003), registraron también en la llanura de SJ, la abundancia de nemátodos Mermithidae, ceratopogónidos y *L. hoffmeisteri*. Este último dominante, lo cual coincide con SJ3-06. En cuanto a E, la dominancia de oligoquetos y la del quironómido *C. gr. decorus*, también fue registrada por estos autores. La abundancia de oligoquetos y quironómidos en ambientes

perturbados por contaminación está ampliamente documentada por numerosos autores en distintas regiones del mundo (Hellawell, 1986; Rosenberg y Resh, 1993; Phipps *et al.*, 1993; Traunspurger y Drews, 1996; Paggi, 1999; Strieder *et al.*, 2006; Correa-Araneda *et al.*, 2010; entre otros). Mientras que en diferentes ambientes lóticos del sistema del río Paraná, ha sido demostrado que la dominancia de ambos grupos taxonómicos no sólo se debe a la contaminación, sino que son propios en estos tipos de ambientes, por las características físicas de los sedimentos de fondo (Marchese y Ezcurra de Drago, 1992, 1999; Marchese, 1997; Pavé y Marchese, 2005; Zilli y Gagnetten 2005; Marchese *et al.*, 2008a). En Brasil, también fue hallada semejante situación en ríos y arroyos del Estado de San Pablo, en donde los Oligochaeta y Chironomidae son dominantes en dichos ambientes por las características geomorfológicas (Roque *et al.*, 2000). Por lo cual, los citados autores sugieren, que en estudios de calidad de agua, la utilización de quironómidos no debe ser analizado a nivel de familia, debido a que es considerado un grupo altamente generalista y tolerante, sino mínimamente a nivel de subfamilia o tribu para que dicha información, y en conjunto con las características ambientales permitan su utilidad como bioindicadores. Así, la dominancia de *L. hoffmeisteri* y *C. xanthus* fueron documentados por Marchese y Ezcurra de Drago (1999), en ambientes semejantes a este estudio, contaminados del río Salado. También ambas especies fueron registradas en las estaciones más afectadas por descargas cloacales e industriales por Pavé y Marchese (2005), en un río urbano (tributario del río Paraná Medio). En el estudio de Zilli y Gagnetten (2005), si bien en todos los ambientes estudiados, se registraron oligoquetos y quironómidos, *C. gr. decorus* fue dominante en los ambientes más contaminados por metales.

Paggi *et al.* (2006), analizaron el bentos del río Matanza (tributario del Río de la Plata), debido al fuerte impacto antropogénico de la zona, como producto de desechos urbanos e industriales, con altas concentraciones de Cr (entre otros tóxicos). Ellos registraron en las zonas más afectadas, al igual que en este estudio, la dominancia de nemátodos y oligoquetos (Naididae principalmente). Según algunos autores (Winner *et al.*, 1980; Millward y Grant, 1995, 2000), ambos grupos son considerados como muy tolerantes a altas concentraciones de metales pesados, incluso algunas especies pueden desarrollar diferentes mecanismos de tolerancia para poder sobrevivir a tales concentraciones (Somerfield *et al.*, 1994; Vatamaniuk *et al.*, 2001). Esto podría explicar la dominancia de los nemátodos con las altas concentraciones de metales en las

estaciones de la llanura de SJ. Sin embargo, se los clasificó según la familia, sin llegar a una identificación a género, lo cual podría haber dado mejor información.

En los biomonitoreos, la información brindada por los GFT que componen una comunidad puede ser un complemento importante en la evaluación de ambientes acuáticos. Se determinó la asignación de dos grupos principales en los ensambles bentónicos en ambas zonas. Así, los depredadores fueron los dominantes sobre el resto de los GFT en la llanura de SJ y los colectores de detritus en las estaciones de la llanura de E. Estos últimos, según varios autores (Plafkin *et al.*, 1989; Rosenberg y Resh, 1993), son considerados como representativos de mala calidad ambiental. Es así, que Kerans y Karr (1994), argumentan la siguiente hipótesis: “Con el incremento del impacto antrópico aumentaría la proporción de colectores de detritus y filtradores, y decrecería la proporción de raspadores, trituradores y depredadores (excepto Tanypodinae e Hirudinea)”. Sin embargo, el gran número de colectores de detritus en estos ambientes, al igual que lo mencionado anteriormente se relaciona a los grupos de organismos más representativos de ríos de llanura (oligoquetos y quironómidos) y debido a que la fracción más importante de materia orgánica, es la particulada fina. Esto coincide con los trabajos realizados en diferentes ambientes lóticos de la cuenca del río Paraná (Marchese y Ezcurra de Drago, 1992, 1999; Marchese, 1997; Higuti y Takeda, 2002; Pavé y Marchese, 2005; Ezcurra de Drago *et al.*, 2007). Un reciente estudio de Dolédec y Statzner (2010), analizan la utilidad de los GFT en biomonitoreos para detectar efectos antrópicos. Entre las razones argumentadas por la que no suelen ser considerados útiles los GFT en el Hemisferio Sur, es debido a resultados hallados en distintos países, donde los organismos tienen hábitos alimentarios generalistas, que aparentemente es una estrategia común entre los invertebrados de sistemas lóticos. Otro aspecto a tener en cuenta, es que son aún muy escasos los conocimientos sobre la dieta de los taxa analizados y por lo tanto se ha asignado un GFT de acuerdo al taxa o especie similar del Hemisferio Norte (según Merrit y Cummins, 1996) como así también utilizando los resultados obtenidos por Motta y Uieda (2004); Poi de Neiff *et al.* (2001 y 2006) y Zilli *et al.* (2008).

Los índices bióticos, son otra herramienta comúnmente utilizada en biomonitoreos, y que han ido reemplazando a los índices de diversidad, por tener en cuenta la composición de los taxa con una valoración de sensibilidad-tolerancia,

ampliando su uso a contaminación inorgánica puntual o difusa. Mediante la aplicación de algunos de ellos, se intentó ampliar la información de los ambientes y evaluar su utilidad en la determinación de la calidad del agua. Sin embargo, con ninguno de ellos se pudo diferenciar ambas zonas, ya que se obtuvieron los mismos resultados para SJ y E. De esta manera, según estos índices, ambas zonas tendrían el mismo grado de contaminación, desde “probable contaminación grave” (ASPT), “contaminación moderada” (Wilhm y Dorris, 1968, mencionado anteriormente para índices de diversidad de Shannon) a “contaminación fuerte” (IBMWP e IMRP). Si bien como ha sido detallado, ambas zonas presentan signos de contaminación por metales pesados, la razón de tales resultados radica en que utilizan taxa que no existen prácticamente en nuestros ambientes, como son las familias de EPT, a las cuales se les asigna en general altos valores, ya que caracterizan ambientes saludables. Mientras que, a las familias registradas y comúnmente presentes en los ambientes analizados, como Oligochaeta, Ceratopogonidae, Chironomidae, Nematoda, Hirudinae, Sphaeriidae, Planorbidae, Ostracoda, e incluso los efemerópteros Polymitarcidae, se les asigna los menores valores relacionados a mala calidad de agua, por lo tanto, los ambientes son subvalorados. La semejante puntuación para los diferentes taxa, dificulta el análisis entre los ambientes, sin embargo el IMRP a diferencia del IBMWP, otorgó valores discriminantes entre ellos, siendo los nemátodos los que recibieron los menores valores. De todos modos, no alcanzó para diferenciar ambas zonas. Los índices aplicados son establecidos mediante puntuaciones a nivel taxonómico de familias, en lo cual también radica la desventaja de su aplicación en ambientes como los que aquí se estudiaron, dado que es esperable que las familias o los géneros/especies dentro de una misma familia tengan diferentes respuestas a la contaminación. Además, encontramos con la aplicación del IBMWP e IMRP, que en las estaciones del cauce (en ambas zonas) se obtuvieron clasificaciones de peor calidad en relación a las estaciones de la llanura. Esto sucedió, porque en el cauce se registraron pocas familias (dada las menores riquezas), y los taxa registrados reciben bajos valores por parte de estos índices. Sin embargo, según se ha explicado anteriormente, por el tipo de sedimento arenoso, los organismos suelen ser poco abundantes en el cauce.

La diferenciación de ambas zonas, fue lograda únicamente mediante la aplicación de relaciones entre los grupos taxonómicos representativos. Así, la relación densidad de oligoquetos *versus* densidad total, y densidad de quironómidos *versus*

densidad total, con una diferencia de casi el doble de ellos en la zona de Esperanza (dada principalmente por los oligoquetos), lo cual es esperable dada la dominancia de nemátodos en SJ. De acuerdo a estas relaciones, E tendría peor calidad del agua.

Algunas perturbaciones pueden no modificar de manera drástica la estructura de una comunidad, pero sí dar lugar a otros cambios no perceptibles a este nivel pero sí a nivel individual. Es el caso de la presencia de tóxicos en el ambiente, como metales pesados, que induce a los organismos a presentar respuestas metabólicas para intentar compensar el problema generado por las condiciones del medio (Domínguez y Fernández, 2009). Al respecto, el análisis de tejidos de macroinvertebrados bentónicos, es muy utilizado en la detección de concentraciones de tóxicos en ambientes acuáticos. La bioacumulación por invertebrados bentónicos permite reflejar las condiciones del ambiente, debido principalmente a sus hábitos sedentarios o con poco movimiento que presentan y a su dieta. Junto a los oligoquetos y quironómidos, los moluscos bivalvos y gasterópodos son los grupos más estudiados en relación a bioacumulación (Howard *et al.*, 1981; Ferreira *et al.*, 2000; Yap *et al.*, 2006; Karayakar *et al.*, 2007; Maanan, 2008; Edward *et al.*, 2009, entre otros). En cuanto a los gasterópodos, los tóxicos son acumulados principalmente en el hepatopáncreas, el cual puede ser extraído fácilmente en el laboratorio y analizarlo.

Por su parte, los humedales o zonas inundables, al tener íntima relación con los ríos, reciben y almacenan los contaminantes. En cuanto a los humedales estudiados, no existen registros de estudios que analicen la concentración de metales en la biota bentónica, y estos ambientes son importantes para la región desde el punto de vista recreativo y económico. Por lo tanto, los resultados obtenidos son un avance para conocer la salud de estos ambientes.

En todos los humedales analizados, se registraron mayores concentraciones de Cu en relación al Cr, en tejido de *P. canaliculata*. Las concentraciones de ambos metales en agua superaron el NGPBA en todos los humedales, a excepción del Cu en Miní (0,005 mg l<sup>-1</sup> Cu). En los tejidos, si bien las concentraciones halladas no revelaron diferencias significativas entre los ambientes, ambos metales fueron superiores en el humedal del río Salado. Estos resultados, permitieron ampliar la información de estos ambientes y determinar el potencial uso de *P. canaliculata* como acumulador para futuros biomonitoreos.

Filion y Morin (2000), mediante la evaluación de concentraciones de metales pesados en diferentes macroinvertebrados (Amphipoda, Decapoda, Gastropoda, Chironomidae y Oligochaeta), hallaron también que el gasterópodo *Bythinia tentaculata*, acumuló las mayores concentraciones de Cu, en relación a otros metales (Cr entre ellos), y a su vez fueron las mayores concentraciones en relación a las registradas en los taxa restantes, siendo muy superiores a la de este estudio ( $292 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Cu}$ ). En cuanto al Cr, el gasterópodo acumuló junto a oligoquetos y quironómidos, las mayores concentraciones, y fueron semejantes entre sí ( $8,5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Cr}$ ) y también superiores a este estudio. Los macroinvertebrados muestran diferencias en la acumulación de metales, las cuales suelen ser metal-específica entre los grupos taxonómicos (Filion y Morin, 2000). Estas diferencias pueden reflejar los hábitos alimentarios y el grado de asociación con el medio, sin embargo además tiene gran influencia, la vía de entrada y regulación del metal por parte del organismo. La mayor concentración del Cu en *P. canaliculata* puede ser explicada por ser el Cu un metal esencial, el cual puede ser regulado por los macroinvertebrados acuáticos (Krantzberg 1989; Krantzberg y Stokes, 1989). Este tópico junto a otro tipo de respuestas en macroinvertebrados, como malformaciones en quironómidos o efectos sobre sus ciclos de vida se desarrollan y amplían en los capítulos siguientes.

En síntesis, tanto el agua como los sedimentos de fondo fueron vías de ingreso de metales para los organismos bentónicos, por lo que se acepta la Hipótesis 1. Al respecto, las concentraciones de todos los metales en agua, fueron superiores a los estándares permitidos, mientras que en el sedimento, si bien no superaron dichos estándares, las concentraciones obtenidas fueron altas. Por lo tanto, los invertebrados bentónicos mediante ambos compartimentos podrían ingresar los metales a sus tejidos, es decir, vía tegumentaria a través del agua y alimenticia (en los organismos detritívoros) a través del agua y del sedimento.

En cuanto a la Hipótesis 2, la concentración de metales en los sedimentos de fondo confirmaría esta hipótesis, ya que fueron mayormente acumulados en las estaciones de la llanura de inundación, mientras que los metales registrados en la columna de agua no mostraron tal comportamiento, salvo el Cr en la zona de referencia. Sin embargo cabe destacar que se deberían hacer más muestreos y con mayor periodicidad.



Con respecto a la Hipótesis 3 planteada, se rechaza, ya que no se pudo establecer un gradiente de calidad del agua, debido a que ambas zonas presentan contaminación. No obstante, se evidenció una diferenciación entre ambas, que fue determinada mediante diferentes ensambles de invertebrados en cada zona y por la relación densidad de oligoquetos y quironómidos, *versus* densidad total y GFT, adjudicando a la zona de E como de peor calidad del agua. Por otra parte, se encontró un aumento desde el cauce a las llanuras de inundación en relación a densidades y riquezas de ambas zonas.

Los resultados obtenidos permitieron determinar diferencias en los ensambles de los macroinvertebrados bentónicos entre ambas zonas, identificándose taxa tolerantes para cada ambiente. Sin embargo SJ no constituye una zona de referencia como se esperaba, porque se registraron altas concentraciones de metales en los tramos estudiados.

# Capítulo 2

---

**Respuestas de *Chironomus gr. decorus*  
(Diptera-Chironomidae) a metales (Cr y Cu)**

Escala microcosmos

## **Capítulo 2: Respuestas de *Chironomus gr. decorus* (Diptera-Chironomidae) a metales (Cr y Cu). Escala microcosmos**

### 2.1. Introducción

Entre los Chironomidae, las larvas de *Chironomus*, son muy utilizadas como bioindicadoras en la evaluación de la calidad de agua de ambientes dulceacuícolas en todo el mundo, ya que son sensibles a metales pesados, plaguicidas, así como a la eutrofización natural o antropogénica de dichos ambientes (ASTM 1999; US EPA, 2000; OECD, 2004). La selección de este género como potencial bioindicador se debe a que es común en América del Sur y como fue mencionado en el capítulo precedente, es un taxa clave en los ensambles bentónicos de los ambientes del río Paraná, tanto lóticos como lenticos, además de su amplia distribución mundial. Su ciclo de vida consiste en dos etapas, una acuática y otra aérea. La acuática desde huevo, pasando por cuatro estadios larvales y el pupal. La aérea, que es corta, perteneciente al estadio de adulto. Entre 19 y 26°C, este género, típicamente completa su ciclo vital en tres o cuatro semanas, haciendo que sea muy conveniente su uso para testear su ciclo de vida completo o parcial en respuesta a tóxicos. De sus estadios larvales, el primero y segundo, son los más recomendados por su sensibilidad-tolerancia en bioensayos.

Las larvas de *Chironomus*, a partir del segundo estadio, construyen sus tubos en el sedimento del fondo, con algas y partículas del sedimento. Ellas se alimentan, ingiriendo detritus y partículas del sedimento de fondo, sacando del tubo su cabeza y parte anterior del cuerpo. Por lo tanto, por estar en contacto directo con el sedimento, el agua intersticial, así como también con la columna de agua, pueden acumular altas concentraciones de metales pesados, principalmente a través de su dieta en la mayor parte de su ciclo de vida, que es el bentónico. El metal recibido de esta manera puede no ser suficiente para matarlos, pero sí puede interferir con algunos aspectos de su ciclo de vida (Kosalwat y Knight, 1987b). Por lo tanto, es importante evaluar los efectos subletales de los metales pesados sobre estos organismos para el uso de ellos como herramienta en biomonitoreos. Esta información es de suma importancia porque las larvas y pupas de los quironómidos son componentes críticos de los sistemas acuáticos del río Paraná, ya que son alimento de los organismos de niveles tróficos superiores,

como otros invertebrados y peces, incluidos los consumidores terrestres (anfibios, aves y murciélagos), facilitando de esta manera la transferencia de los contaminantes.

Los bioensayos crónicos permiten determinar el grado de toxicidad de diversas sustancias químicas (como metales), sobre el crecimiento, emergencia y otros efectos subletales, así como bioacumulación de metales, permitiendo extrapolar los resultados a las condiciones del campo (Rosenberg y Resh, 1993). Tales efectos, han sido analizados por numerosos autores en experiencias de laboratorio con diferentes especies de *Chironomus*, especialmente en el Hemisferio Norte. Sin embargo dichos estudios se han realizado principalmente con metales como el Cd, Cu, Pb, Zn, Hg, mientras que con Cr, son muy escasos. Entre ellos, se han evaluado las respuestas sobre: *C. gr. decorus* (Kosalwat y Knight, 1987b), *C. gr. riparius* (Timmermans *et al.*, 1992; Janssens de Bisthoven *et al.*, 1998; Girling *et al.*, 2000; de Haas *et al.*, 2004; Péry *et al.*, 2005; Dornfeld *et al.*, 2009; Chibunda, 2009), y *C. tentans* (Wentzel *et al.*, 1978; Suedel *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 2003, 2006). Por otra parte, en el Hemisferio Sur la información es limitada, en la mayoría de los casos han sido reportado estudios de toxicidad aguda como la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de Cu y otros metales en *C. calligraphus* en el Perú (Iannacone y Alvaríño, 2004; Iannacone y Zalazar, 2007). Mientras que Printes *et al.* (2007) en Brasil evaluó tanto los efectos letales (CL<sub>50</sub>) como la actividad de los biomarcadores bioquímicos (ChE y GST) del Cu, Cd y el organofosforado paratión en la especie *C. xanthus*.

En las experiencias que se detallarán a continuación, se investigó la capacidad del Cr y Cu en inducir efectos subletales en larvas de *Chironomus gr. decorus*, como: malformaciones bucales, cambios en el desarrollo larval y en la emergencia, y acumulación en sus tejidos, expuestas a diferentes concentraciones de estos metales en laboratorio, a escala de microcosmos. De esta manera, se intentó determinar las causas-efectos de estos metales sobre *C. gr. decorus*, en relación a respuestas de su desarrollo y teratogénesis, que sólo pueden ser reflejadas a nivel del individuo (y/o población) y en condiciones controladas de laboratorio. Con ello, se pretende complementar los resultados obtenidos a nivel de comunidad en campo (en el capítulo precedente), los que demostraron altas concentraciones de Cu y Cr en agua, sedimento y moluscos del río Salado.

2.2. Los objetivos e hipótesis de este capítulo son:

**Objetivos**

- Evaluar la capacidad de acumulación del Cu por *Chironomus* gr. *decorus*, en condiciones de laboratorio.
- Analizar posibles malformaciones y alteraciones en el ciclo de vida en *Chironomus* gr. *decorus* expuesto a metales (Cu y Cr), en condiciones de laboratorio.

**Hipótesis**

- ✓ *Chironomus* gr. *decorus* tiene la capacidad de acumular Cu en sus tejidos.
- ✓ Las alteraciones en el ciclo de vida y malformaciones en *C.* gr. *decorus* serán mayores al aumentar las concentraciones del metal (Cu y Cr).

### 2.3. Materiales y Métodos

#### 2.3.1. Experiencia 1: Efecto del Cu sobre *C. gr. decorus*: malformaciones en piezas bucales y reducción del desarrollo larval

##### *Obtención y aclimatación de los organismos*

Las larvas de *C. gr. decorus* utilizadas en todas las experiencias que se detallarán a continuación fueron obtenidas de un cultivo “stock” del Instituto Nacional de Limnología (CONICET-UNL). Las masas ovígeras separadas del cultivo, fueron colocadas individualmente en recipientes (Fig. 2.1), y se esperó hasta que las larvas alcancen el segundo estadio (8 días de edad) para iniciar las experiencias. Los recipientes contenían una fina capa de sedimento artificial compuesto por arena, arcilla caolín y turba (OECD, 2004) para permitir la construcción de sus tubos-habitáculos y agua declorada y aireada continuamente. Se las mantuvo en ambiente climatizado ( $21 \pm 2^\circ \text{C}$ ), con fotoperíodo 16h luz: 8h oscuridad y fueron alimentadas con Nutrafin ® (comida en escamas para peces) cada 2 días (0,7 mg por larva).



Figura 2.1: Cultivo de las masas ovígeras de *C. gr. decorus* y detalle de dos masas ovígeras bajo lupa.

### *Diseño experimental*

Larvas del segundo estadio de *C. gr. decorus* fueron expuestas a diferentes concentraciones de Cu, para investigar la capacidad de inducir malformaciones bucales y los efectos sobre el desarrollo larval, durante 10 días de exposición crónica (según protocolo US EPA 2000). Las concentraciones fueron elegidas según los resultados de un ensayo agudo previo PROBIT (96h-LC<sub>50</sub>), con larvas del segundo estadio (2,51 mg l<sup>-1</sup> Cu).

Las concentraciones fueron preparadas utilizando una solución stock de 250 mg l<sup>-1</sup> de Cu (como Cu SO<sub>4</sub>.5 H<sub>2</sub>O) y agua de calidad Milli-Q. Los tratamientos analizados fueron: 0,50 (T1), 0,75 (T2), 1,00 (T3) y 1,25 mg l<sup>-1</sup> Cu (T4), y el control (sin Cu). Cada tratamiento fue realizado por triplicado. La experiencia se llevó a cabo en incubadora controlada en las mismas condiciones del cultivo mencionadas anteriormente, en cuanto a temperatura, fotoperíodo, aireación, tipo de sedimento y alimento. Los recipientes utilizados fueron de 200ml y contenían 7g (peso seco) de sedimento artificial y la solución (170 ml) (Fig. 2.2). El sistema test permaneció 48 horas para permitir la partición del Cu entre el agua y el sedimento. Luego de este período, la experiencia se inició con 19 larvas que se distribuyeron aleatoriamente en cada recipiente, teniendo en cuenta que sean de tamaño semejante. Durante el bioensayo, el agua perdida por evaporación fue compensada diariamente con agua de clorada. Todos los materiales utilizados fueron previamente lavados con 2N HNO<sub>3</sub>. Todos los reactivos fueron de grado analítico y las soluciones usadas fueron preparadas con agua Milli-Q.

### *Mediciones físicas y químicas*

Durante la experiencia, se midió diariamente temperatura y oxígeno disuelto (YSI 55), y el pH fue chequeado dos veces por semana con Horiba U10 check water. La dureza total (método titrimétrico) y la concentración de amonio (método colorimétrico) fueron analizadas según APHA (1998), al principio y al final de la experiencia. Al inicio y al final de la experiencia se determinó la concentración real del metal en agua y sedimento en todos los tratamientos. Las concentraciones iniciales no difirieron en >8% de las nominales. En cuanto a las finales, todos los porcentajes de remoción resultaron superiores al 90% de las concentraciones estudiadas.

La preparación de los tratamientos y las determinaciones de temperatura, pH y OD fueron realizadas por la tesista, mientras que la determinación de dureza y amonio fueron realizadas por personal del INALI. La determinación del Cu al inicio y final de la experiencia fue determinada por espectrómetro de emisión por plasma en laboratorio especializado (ICP, Shimadzu - 1000 III, Laboratorio de Análisis Químicos-LANAQUI, Bahía Blanca, Bs.As).

### *Análisis de los datos*

Al finalizar los 10 días del período de exposición, las larvas fueron separadas del sedimento, se contaron aquellas sobrevivientes y se conservaron en etanol (al 70%), hasta el montaje de sus cápsulas cefálicas. Previamente al montaje, se separaron los cuerpos de sus cabezas y luego las cápsulas cefálicas fueron colocadas dorsalmente en portaobjetos (Fig. 2.2). Se las fijó con medio de Hoyer y se cubrieron con cubreobjetos, con el fin de analizar en microscopio las estructuras anatómicas de la parte ventral de la cabeza (especialmente las posibles modificaciones de los dientes del mentón y mandíbulas). Las malformaciones bucales fueron identificadas usando un microscopio estándar a 400x. Los tipos de malformaciones fueron consideradas siguiendo el criterio de Dickman *et al.* (1992) como: pérdida, extra, con hendidura, torsión o fusión de dientes, como también mandíbulas y mentón asimétricos. Las larvas fueron consideradas deformadas cuando tenían al menos una malformación en el mentón o en sus mandíbulas. Los datos de malformaciones bucales de cada réplica fueron reunidos en un pool para determinar la tasa de malformación total en el control y en cada concentración de Cu, de acuerdo a Martínez *et al.* (2006) como: la suma del total de larvas deformadas en las réplicas 1 a 3, dividido por la suma del total de las larvas. Los datos fueron expresados en porcentajes.

Para evaluar el desarrollo de *C. gr. decorus*, los estadios fueron determinados mediante el largo ventromental de la cápsula cefálica, siguiendo el criterio usado por Strixino y Strixino (1982). Se analizó para cada tratamiento una submuestra de 10 cápsulas cefálicas, usando un ocular micrométrico para su determinación.

### *Análisis estadísticos*



Los análisis estadísticos de los datos consistieron en el Análisis de la Varianza (ANOVA one-way), seguido del test de comparación múltiple de Tukey para determinar las diferencias significativas en los parámetros físicos y químicos, la supervivencia larval y los datos de las mediciones del largo ventromental de las cápsulas cefálicas. Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza fueron comprobados mediante los residuos, como fue explicado en el capítulo precedente. Los datos fueron transformados previamente a los análisis cuando fuera necesario al  $\log_{10}$ , para satisfacer los requerimientos de dichos supuestos. Cuando los datos no fueron normalmente distribuidos se aplicó el test Kruskal-Wallis, seguido de test de comparación múltiple. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa software STATISTICA (versión 7.1, StatSoft, Inc. 2005), con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ .

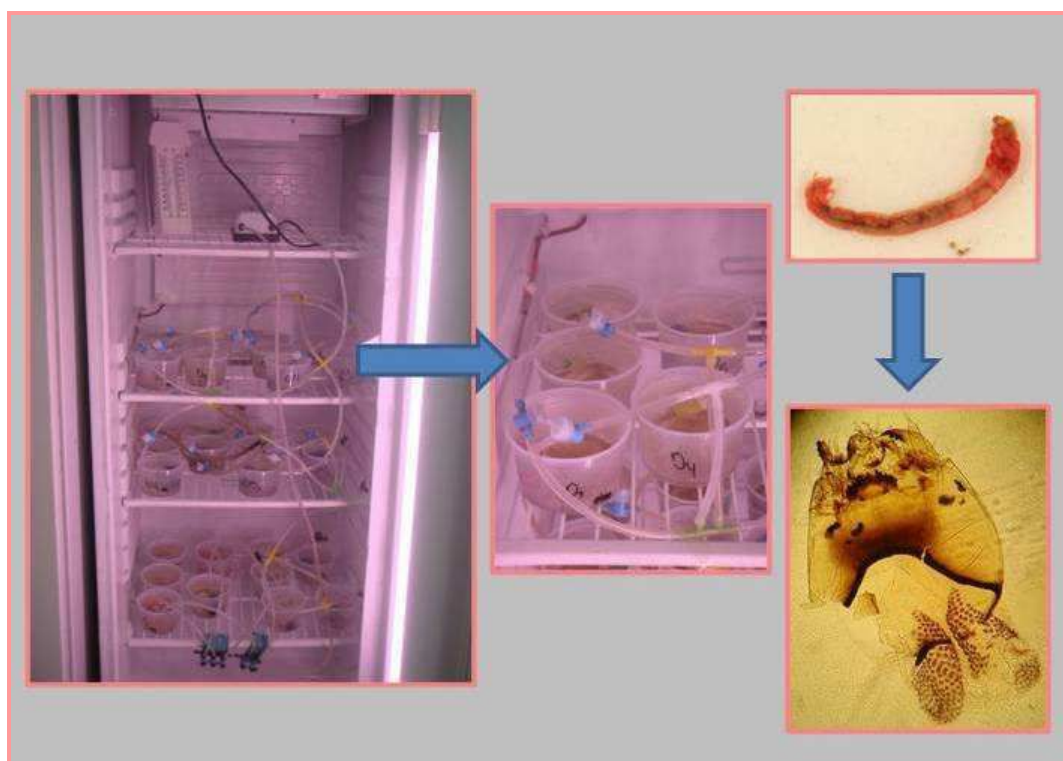


Figura 2.2: Incubadora usada en la experiencia, con los diferentes tratamientos-recipientes estudiados. También se muestra una larva de *C. gr. decorus* y su cápsula cefálica normal, bajo microscopio.

### 2.3.2. Experiencia 2: Acumulación de Cu en *C. gr. decorus*

### *Diseño experimental*

Larvas del segundo estadio de *C. gr. decorus* fueron expuestas a dos concentraciones subletales de Cu para investigar la capacidad de acumulación durante su desarrollo hasta el 4° estadio larval, durante 10 días de exposición. Las concentraciones fueron elegidas según un ensayo agudo previo (96h-LC<sub>50</sub>), tal como fue mencionado en la experiencia anterior.

La metodología de esta experiencia fue la misma a la explicada en la experiencia 1, salvo que aquí las concentraciones fueron: 0,75 y 1,00 mg l<sup>-1</sup> Cu, y el control (sin Cu). Cada tratamiento fue llevado a cabo por triplicado. En este caso los recipientes utilizados fueron mayores (1,5 l), con la fina capa de sedimento artificial (40 g de peso seco) y la solución (1 l). Luego del período de equilibrio del Cu entre los compartimentos (agua y sedimento), la experiencia se inició con 75 larvas del segundo estadio, que se distribuyeron aleatoriamente en cada recipiente, teniendo en cuenta que sean de tamaño semejante. Finalizada la exposición, se tomaron muestras de agua, sedimento y tejido de las larvas para analizar concentraciones del Cu en cada compartimento. Se contaron las larvas sobrevivientes y posteriormente fueron colocadas en agua declorada limpia con aireación constante durante 12 h para purgar su contenido intestinal (Fig. 2.3). Las heces fueron retiradas a fin de evitar la coprofagia. Por último, fueron enjuagadas para eliminar cualquier tipo de residuos, secadas a estufa a peso seco constante y congeladas a - 20 ° C para su posterior análisis.

### *Mediciones físicas y químicas*

Las muestras de agua, sedimento y tejido fueron tratados de acuerdo a la US EPA (1991) según los métodos 200.2 y 200.3, respectivamente, para la determinación del Cu total. Durante la experiencia, también se midieron los parámetros físicos y químicos como en la experiencia 1. En este caso, se determinó la concentración de Cu en agua, sedimento y en tejido de las larvas, coincidiendo los valores hallados con lo mencionado en la experiencia anterior.

### *Análisis de los datos*

Se calcularon los siguientes factores:

- 1) El factor de acumulación de Cu (FAs), como la concentración promedio total del Cu en el tejido larval, dividido por la concentración promedio del Cu en sedimento.
- 2) El factor de concentración de Cu (FCa), como la concentración promedio total del Cu en el tejido larval, dividido por la concentración promedio del Cu en el agua.

### *Análisis estadísticos*

Los análisis estadísticos de los datos también consistieron en el ANOVA y Tukey ( $p < 0,05$ ), para determinar las diferencias significativas en los parámetros físico-químicos, la supervivencia larval y las concentraciones de Cu en agua, sedimento y tejido entre los tratamientos. Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, y las transformaciones de los datos, así como el software utilizado, fueron los mismos que los mencionados para la experiencia anterior.



Figura 2.3: Incubadora con los tratamientos-recipientes. Se muestra además, la separación de los organismos del sedimento y larvas depurando sus intestinos.

### 2.3.3. Experiencia 3: Efecto del Cu sobre la emergencia en *C. gr. decorus*

La metodología se llevó a cabo de la misma manera a la expuesta en el experiencia 1, así como también las concentraciones analizadas en esta experiencia: 0,50 (T1); 0,75 (T2); 1,00 (T3) y 1,25 mg l<sup>-1</sup> Cu (T4), además del control. En este caso, cada recipiente contenía 14 larvas, y la experiencia se llevó a cabo durante 29 días, para que los organismos alcancen su etapa de adulto. La supervivencia de larvas y pupas y la emergencia de los adultos se controlaron cada 24h. Se midieron los parámetros físicos y químicos como en las experiencias anteriores y las concentraciones reales analizadas al inicio y al final de la experiencia coincidieron con los valores mencionados en la experiencia 1.

Los análisis estadísticos de los datos al igual que en las experiencias anteriores, fueron ANOVA y test de Tukey ( $p < 0,05$ ), para determinar las diferencias significativas en los parámetros físico-químicos, supervivencia larval y adultos emergidos entre los tratamientos. Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza y las transformaciones de los datos, así como el software utilizado, fueron realizados tal lo mencionado para las experiencias anteriores.

### 2.3.4. Experiencia 4: Efecto del Cr sobre *C. gr. decorus*: emergencia y malformaciones bucales

La metodología fue la misma empleada para la experiencia 1, en este caso la solución stock fue preparada con dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ) y agua de clorada. Las concentraciones analizadas fueron: 0,50 (T1); 0,75 (T2); 1,00 (T3) y 1,25 mg l<sup>-1</sup> Cr (T4), y el control. Estas concentraciones fueron seleccionadas a partir de un test agudo previo PROBIT ( $LC_{50}$  96h), con larvas del segundo estadio (3,8 mg l<sup>-1</sup> Cr). El registro de organismos sobrevivientes, tiempo de exposición, montajes de cápsulas cefálicas, mediciones de parámetros físicos y químicos y análisis estadísticos, se realizaron según lo explicado en las experiencias 1 y 3. En este caso cada recipiente contenía 12 larvas.

## 2.4. Resultados

2.4.1. Experiencia 1: Efecto del **Cu** sobre *C. gr. decorus*: malformaciones en piezas bucales y reducción del desarrollo larval.

### *Calidad del agua*

Durante los 10 días de exposición, la temperatura promedio fue 21,28 ( $\pm 0,44$ ) °C, el oxígeno disuelto 6,64 ( $\pm 0,46$ ) mg l<sup>-1</sup>, el pH 6,47 ( $\pm 0,22$ ), la dureza total 175 ( $\pm 9,12$ ) mg l<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub> y la concentración de amonio 4,72 ( $\pm 0,99$ ) mg l<sup>-1</sup>. No se encontraron diferencias significativas de estos parámetros, entre los tratamientos ( $p > 0,05$ ).

### *Supervivencia*

El porcentaje promedio de larvas sobrevivientes luego de 10 días de exposición fue 88% en el control y 75% en las concentraciones de Cu. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el T2 con el control y con el resto de las concentraciones, a excepción de T4.

### *Malformaciones y desarrollo larval*

Se encontraron malformaciones bucales en las larvas expuestas a partir de 0,75 mg l<sup>-1</sup> Cu (T2), no encontrándose malformaciones en los individuos del control (Fig. 2.4). El porcentaje de malformaciones bucales osciló entre 2,3 y 5,1 %, correspondiendo el mayor valor a la mayor concentración (T4), sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. Los tipos de malformaciones fueron: la pérdida de dientes en el mentón (el diente medio trífido o los laterales) y en las mandíbulas (T2 y T4), también se encontraron dientes extra en las mandíbulas (T3) (Fig. 2.5).

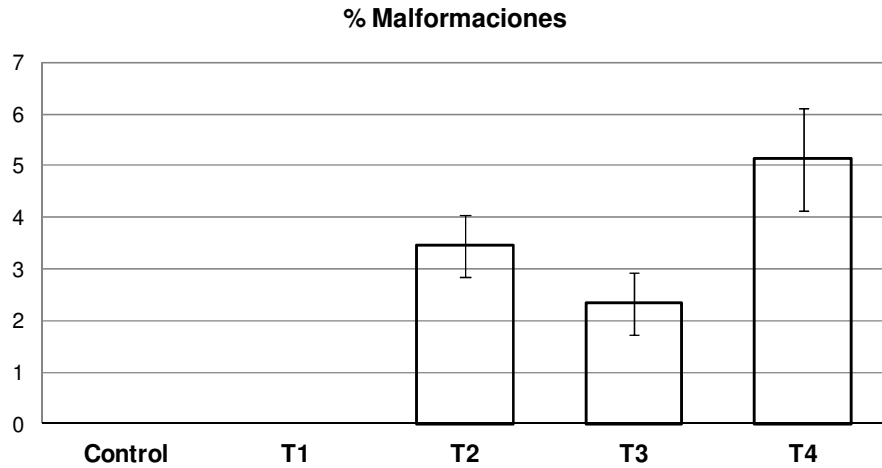


Figura 2.4: Porcentaje (media  $\pm$  SD) de malformaciones bucales en las larvas, luego de 10 días de exposición, en todos los tratamientos. T1:0,50 mg l<sup>-1</sup> Cu, T2:0,75 mg l<sup>-1</sup> Cu, T3:1,00 mg l<sup>-1</sup> Cu, T4:1,25 mg l<sup>-1</sup> Cu. Cada tratamiento, n: 3 réplicas, 57 larvas. Estas referencias se repiten en las siguientes figuras.

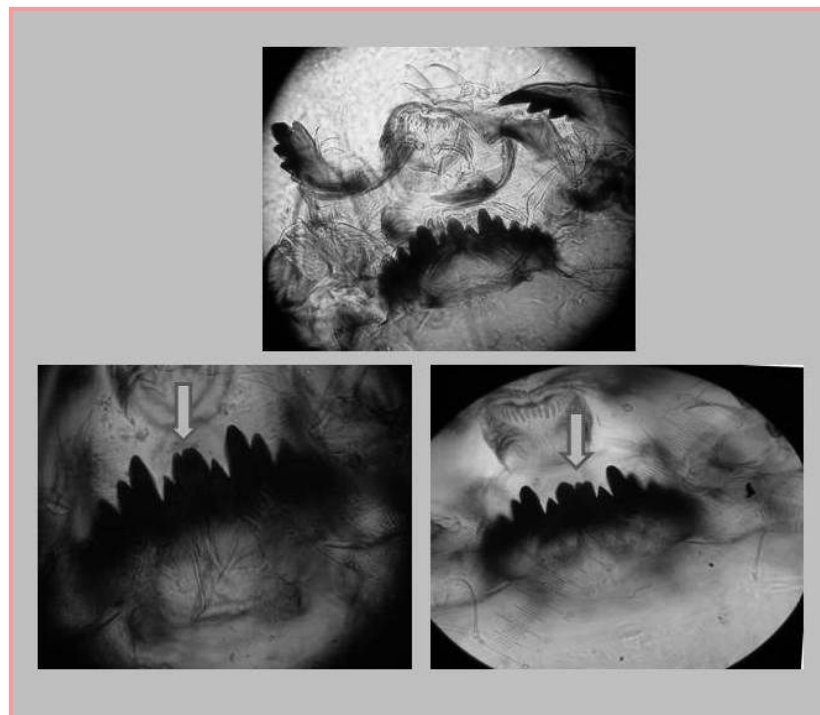


Figura 2.5: Cápsulas cefálicas de larvas con mentón y mandíbulas normales (arriba) y con mentones malformados, en el diente medio trívido (abajo).

La figura 2.6, muestra los promedios del largo ventromental de las cápsulas cefálicas en las larvas analizadas, no encontrándose diferencias significativas a los 10

días de exposición entre el control (0,28 mm), T1 (0,26 mm), y T4 (0,24 mm). Mientras que una inhibición del desarrollo significativo ( $p < 0,05$ ) fue observado en los organismos de T2 (0,19 mm) y T3 (0,18 mm). De esta manera se pudo determinar el desarrollo larval, donde el 4° estadio fue alcanzado en los organismos del control (90%) y T1 (80%) al final de la exposición. En el resto de los tratamientos el desarrollo fue inhibido, y alcanzaron el 3° estadio larval, aunque el 50% de las larvas del T4 lograron alcanzar el 4° estadio (Fig. 2.7).

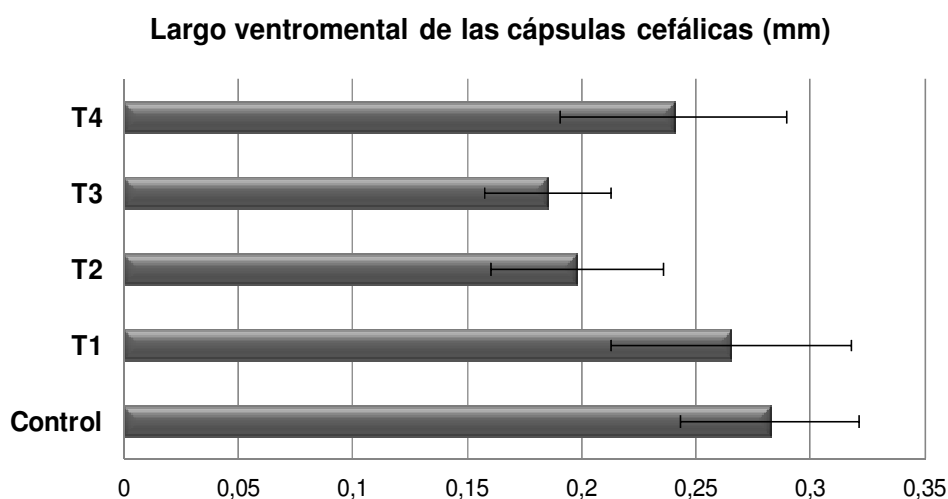


Figura 2.6: Largo ventromental (mm) de las cápsulas cefálicas larvales (media  $\pm$  SD), luego de los 10 días de exposición en todos los tratamientos. Cada tratamiento, n: 3 réplicas, 30 larvas.

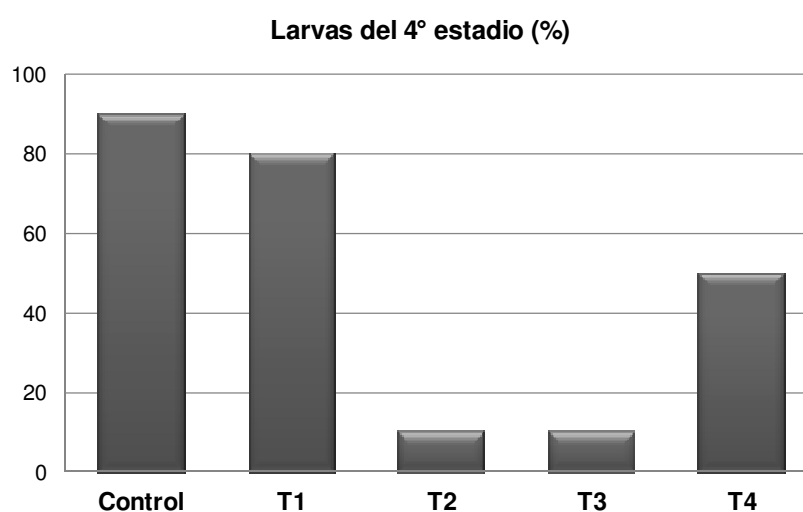


Figura 2.7: Porcentaje de las larvas que alcanzaron el 4º estadio, luego de 10 días de exposición, en todos los tratamientos.

#### 2.4.2. Experiencia 2: Acumulación de Cu en *C. gr. decorus*

##### Calidad del agua

Durante el período de exposición, la temperatura promedio fue 21,06 ( $\pm 0,48$ ) °C, el oxígeno disuelto 6,89 ( $\pm 0,20$ ) mg l<sup>-1</sup>, el pH 6,24 ( $\pm 0,24$ ) y la dureza total 136,63 ( $\pm 8,09$ ) mg l<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>. La concentración de amonio registrada coincidió con los valores de la experiencia 1. No se encontraron diferencias significativas para las variables físicas y químicas entre los tratamientos ( $p > 0,05$ ).

##### Supervivencia

El porcentaje promedio de supervivencia larval fue 98% en el control y 94% en ambas concentraciones de Cu. La mayor concentración mostró diferencia significativamente menor ( $p < 0,05$ ) al resto de los tratamientos.

##### Acumulación del cobre

La concentración del Cu en agua, sedimentos de fondo y tejidos larvales luego de 10 días de exposición evidenció diferencias significativas entre los tratamientos de cada compartimento ( $p < 0,05$ ). Al incrementar la concentración del Cu en la solución test, un incremento de la acumulación del Cu se observó en el sedimento, mientras que en las larvas se encontró una relación inversa. (Fig. 2.8)

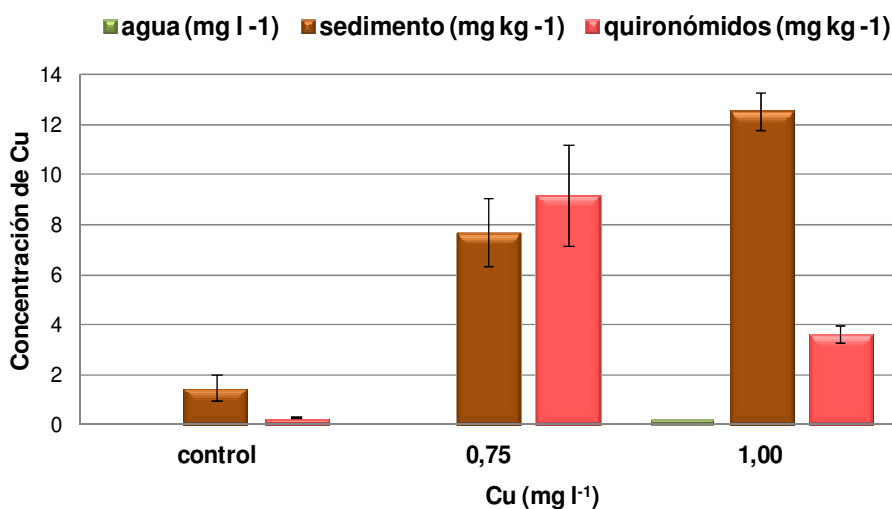




Figura 2.8: Concentración del Cu (media  $\pm$  SD) en agua, sedimentos de fondo y tejidos larvales en todos los tratamientos. Cada tratamiento, n: 3 réplicas, 225 larvas.

Los factores de acumulación (FAs) fueron 1,2 ( $\pm$  0,4) y 0,3 ( $\pm$  0,01) para 0,75 y 1,00 mg l<sup>-1</sup> Cu, respectivamente, indicando que el sedimento fue el principal compartimento acumulador de dicho metal. Por otro lado, los factores de concentración (FCa) fueron 69,6 ( $\pm$  8,7) y 17,5 ( $\pm$  1,9) para la menor y mayor concentración respectivamente. Cada factor fue calculado con n:3 réplicas por tratamiento.

### 2.4.3. Experiencia 3: Efecto del **Cu** sobre la emergencia de *C. gr. decorus*

#### *Calidad del agua*

Durante el período de exposición, la temperatura promedio fue 21,80 ( $\pm$ 0,46) °C, el oxígeno disuelto 5,1 ( $\pm$ 0,39) mg l<sup>-1</sup>, el pH 7,2 ( $\pm$ 0,14) y la dureza total 175 (22,94) mg l<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>. La concentración de amonio coincidió dentro de los valores registrados en la experiencia 1. No se encontraron diferencias significativas de tales parámetros entre los tratamientos (p>0,05).

#### *Supervivencia*

El porcentaje promedio de supervivencia (larva, pupas y adultos) fue 97% en el control y 75 % en las concentraciones de Cu. No se obtuvieron diferencias significativas entre el control, T1 y T2. Mientras que T3 y T4 fueron significativamente menores (p<0,05) al resto de los tratamientos (pero no entre sí). Siendo las larvas quienes presentaron mayor mortalidad.

#### *Emergencia*

El porcentaje promedio de la emergencia luego de los 29 días de exposición fue 97% en los organismos del control y 71 % en las concentraciones de Cu (Fig. 2.9). No se observaron diferencias significativas entre el número de emergidos del control, T1 y T2. Mientras que en T3 y T4 las emergencias fueron significativamente menores al resto, y entre sí (p<0,05), registrándose el menor número de emergidos en T4. Esta

última concentración mostró además, un retardo de tres días de los individuos para emerger (día 16), en relación al resto, mientras que T1 y T2 emergieron uno y dos días antes al control (Fig. 2.10).

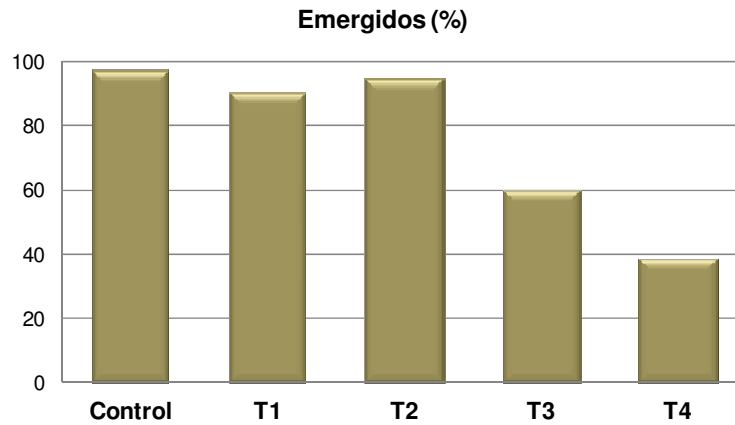
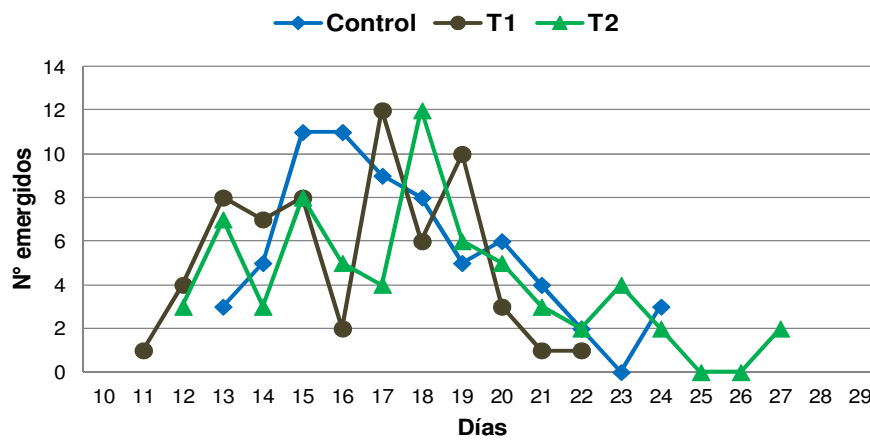


Figura 2.9: Porcentaje de emergidos durante la experiencia, en todos los tratamientos. T1:0,50 mg l<sup>-1</sup> Cu, T2:0,75 mg l<sup>-1</sup> Cu, T3:1,00 mg l<sup>-1</sup> Cu, T4:1,25 mg l<sup>-1</sup> Cu. Estas referencias se repiten en las siguientes figuras.



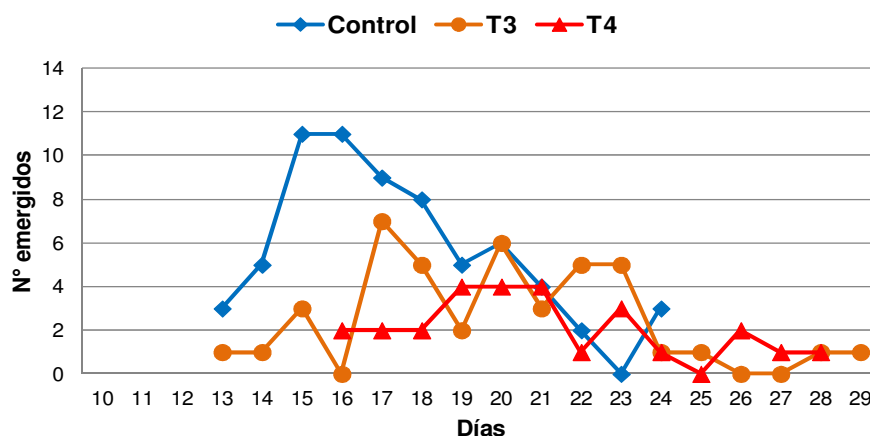


Figura 2.10: Número de adultos emergidos durante la experiencia en todos los tratamientos. Control *versus* T1 y T2 (arriba). Control *versus* T3 y T4 (abajo).

#### 2.4.4. Experiencia 4: Efecto del Cr sobre *C. gr. decorus*: emergencia y malformaciones bucales

##### *Calidad del agua*

Durante el período de exposición, la temperatura promedio fue  $21,35 (\pm 0,88) ^\circ\text{C}$ , el oxígeno disuelto  $6,61 (\pm 1,06) \text{ mg l}^{-1}$ , el pH  $8,03 (\pm 0,45)$ , mientras que la dureza total  $143 (\pm 7,03) \text{ mg l}^{-1} \text{ CaCO}_3$ . La concentración de amonio coincidió dentro de los valores registrados para las experiencias con Cu. No se encontraron diferencias significativas para dichos parámetros entre los tratamientos ( $p > 0,05$ ).

##### *Supervivencia*

La supervivencia a lo largo de la experiencia (larvas, pupas y adultos) en todos los tratamientos, osciló entre 55 y 65 %, sin obtenerse diferencias significativas entre ellos ( $p: 0,84$ ). Al igual que en la experiencia con Cu, las larvas fueron las que presentaron mayor mortalidad.

##### *Emergencia*

El porcentaje promedio de emergencia en los individuos del control, fue 55%, mientras que en las distintas concentraciones fue 58%, sin encontrarse diferencias significativas entre los tratamientos ( $p: 0,69$ ) (Fig. 2.11). La emergencia de los individuos comenzó el día 15, en todos los tratamientos. Por otra parte, en todas las

concentraciones a excepción de la mayor (T4), al día 19, se registraron los mayores números de emergidos. Mientras que en el control y T4, sucedió al día 21 (Fig. 2.12).

*Malformaciones*

En esta experiencia, no se registraron malformaciones en las cápsulas cefálicas en ninguno de los tratamientos.

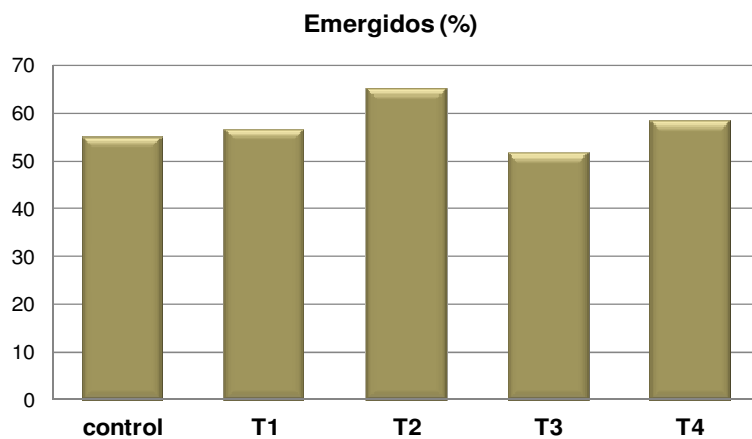
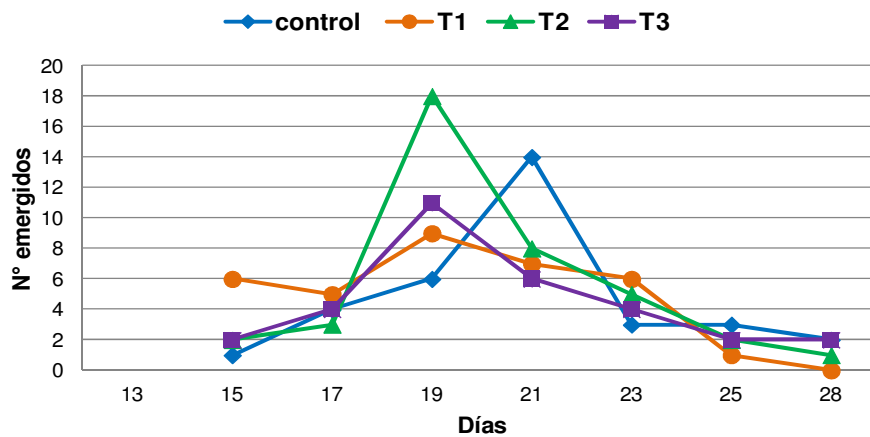


Figura 2.11: Porcentaje de emergidos durante la experiencia, en todos los tratamientos. T1:0,50 mg l<sup>-1</sup> Cr, T2:0,75 mg l<sup>-1</sup> Cr, T3:1,00 mg l<sup>-1</sup> Cr, T4:1,25 mg l<sup>-1</sup> Cr. Estas referencias se repiten en la siguiente figura.



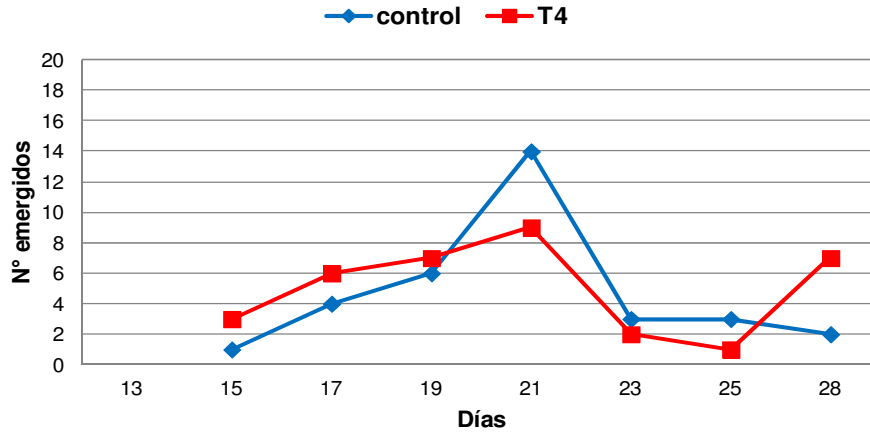


Figura 2.12: Número de adultos emergidos durante la experiencia en todos los tratamientos. Control *versus* T1, T2 y T3 (arriba). Control *versus* T4 (abajo).

## 2.5. Discusión

Este estudio permitió determinar algunas respuestas subletales del Cu y Cr sobre el grupo Neotropical *C. gr. decorus*, en condiciones de laboratorio.

Las condiciones experimentales de los controles en todas las experiencias con Cu (Ej.: aireación, alimento, temperatura, pH, oxígeno disuelto), estuvieron dentro del rango recomendado por el protocolo de la US EPA (2000) para bioensayos con *C. tentans*. La concentración de amonio fue menor a la concentración letal reportada para invertebrados bentónicos (21,4 mg l<sup>-1</sup>) por Schubauer-Berigan *et al.* (1995). Por lo tanto, dichas condiciones permitieron una alta supervivencia ( $\geq 70\%$ ), desarrollo larval adecuado (alcanzando el 4° estadio larval) y emergencia ( $\geq 70\%$ ), en relación a las experiencias con Cu, en coincidencia con los requisitos de la US EPA (2000).

Mientras que en la experiencia con Cr, luego de 2 repeticiones y ajustes de la metodología, la supervivencia en el control alcanzó solo el 55%, sin encontrarse características ambientales que pudieran haber afectado las experiencias. No se pudo dilucidar la alta mortalidad del control, aún con experiencias realizadas sin contaminantes y diferentes marcas de alimento que se supuso podían afectar la supervivencia larval. Por otra parte, el tiempo seleccionado de cada experiencia, fue suficiente para reflejar las respuestas pautadas en los objetivos. Esto es posible, porque *C. gr. decorus* posee un ciclo de vida relativamente corto, permitiendo su utilidad para determinar efectos subletales causados por metales.

Si bien han sido realizados previamente LC<sub>50</sub> con Cu (Iannacone y Alvariño, 2004; Printes *et al.*, 2007) en especies como *C. calligraphus* (0,30 mg l<sup>-1</sup> Cu) y *C. xanthus* (0,34 mg l<sup>-1</sup> Cu) respectivamente, las concentraciones halladas por estos autores son mucho menores a la encontrada y testada en estas experiencias. Las diferencias entre estos resultados pueden ser atribuibles a varios factores. Uno de ellos, es el tiempo de exposición, que fue mayor en este estudio (96h) comparado con las 48h en Iannacone y Alvariño (2004). Otro, la diferencia en los estadios larvales (edades de las larvas), en este caso se utilizaron larvas del 2° estadio, mientras que en Iannacone y Alvariño (2004) expusieron larvas del 1° estadio y en Printes *et al.* (2007), del 4° estadio. Este último aspecto, es muy importante, porque las larvas del 1° estadio (que además son planctónicas), son las más sensibles a los contaminantes comparadas con las del 2° o 3°

estadio, mientras que las del 4° estadio son las más resistentes. Por lo tanto, lo recomendable es el uso del 2° o 3° estadio (ASTM, 1999). Esto fue documentado con varios metales en *Chironomus*, entre ellos con el Cu, en donde la sensibilidad larval al metal disminuía con la edad (Péry *et al.*, 2003). Por último, cabe destacar que las características físicas y químicas de los ensayos fueron diferentes. Tanto las malformaciones bucales como la reducción del desarrollo larval fueron registradas a partir de concentraciones  $\geq 0,75 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}$ , y no se observaron individuos afectados en el control. De esta manera estos resultados representan efectos subletales causadas por la toxicidad del Cu y pueden ser considerados como señales tempranas de la degradación del medio acuático, tal fuera expresado por Warwick (1985). Por otra parte, en la experiencia con Cr, no se registraron malformaciones bucales.

La inducción de malformaciones bucales por metales pesados en larvas de *Chironomus* en condiciones de laboratorio, ha sido reportada por varios autores (Janssens de Bisthoven *et al.*, 1992, 1998, 2001; Vermeulen *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2003, 2006; Dias *et al.*, 2008). En relación al Cu, Kosalwat y Knight (1987b), también registraron malformaciones bucales en *C. gr. decorus*, aunque ellos usaron un sustrato diferente y las concentraciones fueron mayores a las testeadas aquí. Por otro lado, los porcentajes de malformaciones obtenidos en esta tesis, son muy similares a los registrados por Martinez *et al.* (2003), en *C. tentans*. Sin embargo estos autores utilizaron también mayores concentraciones de Cu y obtuvieron además individuos con malformaciones en el control (3%). Por lo tanto resulta complejo al momento de comparar entre experiencias, ya que al igual que con los ensayos agudos, existieron diferencias en las condiciones del medio testeado y de las larvas, como también del propio género, lo que dificulta la conclusión con respecto a la toxicidad del metal.

Por otra parte, en Sudamérica existen registros de larvas de *Chironomus* sp., con malformaciones bucales de sedimentos contaminados provenientes del campo. Callisto *et al.* (2000) y Kuhlmann *et al.* (2000), reportaron entre 3 y 8 % de malformaciones en el mentón de *Chironomus* sp., en ríos de Brasil, donde las estaciones muestreadas exhibían altos contenidos de metales pesados y contaminantes orgánicos. Ellos indicaron una fuerte relación entre la incidencia de malformaciones y la concentración de los tóxicos en el sedimento. En cuanto a la Argentina, se han detectado malformaciones bucales en *Chironomus calligraphus*, provenientes de un arroyo con

sedimentos contaminados por metales (mayormente Pb) en porcentajes semejantes a los autores citados anteriormente (Cortezzi *et al.*, 2011). Mientras que Nazarova *et al.* (2004), quienes investigaron las malformaciones en quironómidos en canales de la ciénaga Grande de Santa Marta en Colombia, encontraron un alto porcentaje de malformaciones bucales (21%, mayormente en el género *Goeldichironomus* y *Chironomus*), pero las concentraciones de metales registradas fueron bajas. La explicación dada a este hallazgo contradictorio asume un sinergismo no detectado de varios estresores ambientales.

Las malformaciones bucales en las larvas puede afectar la alimentación y consecuentemente el crecimiento (Cushman, 1984), y es un indicador que puede ser chequeado rápidamente en el campo para revelar la posibilidad de contaminación por metales (Kosalwat y Knight, 1987b). De esta manera si los ensambles de quironómidos son abundantes, como en el sistema del río Paraná, puede ser posible determinar diferencias en las tasas de malformaciones bucales entre ambientes, describiendo con ello un gradiente de contaminación.

En Sudamérica, hasta el presente no existe un parámetro para establecer una base de frecuencia de malformaciones bucales en *Chironomus* sp., por lo cual me remití al uso del porcentaje para sitios no contaminados (1%) definido por Wiederholm (1984). En este estudio los porcentajes obtenidos en las experiencias con Cu fueron mayores al reportado por dicho autor (2 a 5%), indicando que existen efectos teratogénicos del Cu sobre estos organismos. Por otra parte, en el caso del Cr, no se registraron malformaciones bucales, y las larvas presentaron alta mortalidad a diferencia del la experiencia con Cu.

En relación al desarrollo larval, es bien conocido que los metales pesados (el Cu entre ellos) en los sedimentos pueden causar la inhibición del crecimiento en larvas de quironómidos (Nebeker *et al.*, 1984; Pascoe *et al.*, 1989; Péry *et al.*, 2003; De Haas *et al.*, 2004; Servia *et al.*, 2006; Días *et al.*, 2008, entre otros). Se encontró mediante el análisis de las mediciones en el largo ventromental de las cápsulas cefálicas, una reducción en el desarrollo larval significativo, siendo afectadas a concentraciones  $\geq 0,75$  mg l<sup>-1</sup> Cu. De esta manera las larvas expuestas a 0,75 y 1,00 mg l<sup>-1</sup> Cu, fueron inhibidas por el metal en un 90%, ya que se desarrollaron solo hasta el 3° estadio. Sin embargo, se



halló que el 50% de las larvas en la mayor concentración (1,25 mg l<sup>-1</sup> Cu) también alcanzaron el 4° estadio. Esto sugiere que estos organismos tienen algún mecanismo de regulación del Cu, permitiéndoles a las larvas sobrevivir y desarrollarse. Los resultados encontrados en este estudio coinciden con el de Hatakeyama y Yasuno (1981), quienes encontraron que las larvas de *Paratanytarsus parthenogeneticus* expuestas a concentraciones mayores a 0,64 mg l<sup>-1</sup> Cu, no se desarrollaban, y los sucesos reproductivos disminuían al aumentar las concentraciones de Cu. Otros estudios con quironómidos, han revelado también el efecto negativo del Cu sobre el desarrollo, como Timmermans *et al.* (1992) y Girling *et al.* (2000) en larvas de *C. riparius*, sin embargo han utilizado concentraciones mucho más bajas (0,010 a 0,10 mg l<sup>-1</sup> Cu).

La emergencia, es otro parámetro importante en el ciclo de vida de estos organismos. Los adultos emergidos son presa de muchos animales terrestres, como los anfibios, aves y murciélagos, y por lo tanto la carga de contaminantes que pueden acumular también puede ser transmitida a niveles tróficos superiores terrestres, mediante el proceso de biomagnificación. Además, la disminución en la emergencia de estos organismos por contaminación, puede resultar a lo largo de varias generaciones en una reducción importante del tamaño poblacional (Liber *et al.*, 1996). En la experiencia con Cu, tanto en el control como en todas las concentraciones de Cu, los días en que comenzó la emergencia concuerdan con el ciclo de vida de este género en condiciones de laboratorio en un rango de temperatura de 19-26°C, según Strixino y Strixino (1982). En contraste, el número de adultos emergidos fue significativamente menor en las mayores concentraciones, reduciéndose casi al 50% en relación al control, mostrando la influencia negativa del Cu sobre la emergencia en estos individuos. Por el contrario, en la experiencia con Cr, no se encontraron diferencias significativas en el número de individuos emergidos entre todos los tratamientos (inclusive el control). Como ya fue comentado, debido a la alta mortalidad larval, el número de los individuos emergidos del control fue menor al requerido por la US EPA (2000). Por otra parte, el día en que comenzaron a emerger los adultos en todos los tratamientos, también coincidió con el ciclo de vida de este género.

Se han realizado varios estudios de toxicidad por metales pesados en relación a la emergencia en quironómidos (Wentzel *et al.*, 1978; Kosalwat y Knight, 1987b; Pascoe *et al.*, 1989; Timmermans *et al.*, 1992; Martínez *et al.*, 2003; Péry *et al.*, 2005,

Chibunda, 2009). Los resultados hallados por dichos autores, coinciden con los obtenidos en la experiencia de *C. gr. decorus* y Cu, en donde la emergencia es afectada por el metal, disminuyendo el número de individuos emergidos expuestos al Cu. Sin embargo, en el caso del Cr, no se obtuvieron diferencias significativas. Otro aspecto de la emergencia que es estudiada, se relaciona con los días en que la mayor parte de los individuos expuestos a los tóxicos emerge, retrasando o adelantando el suceso de emergencia. Si bien el día en que comenzaron los individuos a emerger en ambas experiencias coincide con el ciclo de vida de este género, se observó que el mayor número de individuos expuestos al Cu, emergió días posteriores al control, lo cual coincide también con los resultados de los autores mencionados anteriormente, en que el metal retarda la emergencia. Mientras que con el Cr (a excepción de la concentración mayor), sucedió lo contrario, ya que la mayoría de ellos emergieron antes que el control. El adelanto de estos individuos emergidos, podría ser interpretado como una estrategia para eludir el estrés del ambiente contaminado.

La bioacumulación, es a menudo un buen indicador integrativo de las exposiciones de los organismos a los contaminantes (Luoma y Rainbow, 2005). Es esperable que la mayoría de los metales presentes en sistemas contaminados sean adsorbidos rápidamente por las partículas superficiales del sustrato y cuando el sedimento es ingerido por los invertebrados detritívoros, los metales son asimilados por el tracto digestivo de los mismos. También es conocido que los metales solubles son fácilmente asimilables a través del tegumento de muchos organismos, en concentraciones que pueden resultar en toxicidad letal o crónica. Así las actividades normales de la fauna expuesta a sustratos con metales solubles o adsorbidos a sedimentos pueden ser buenos indicadores de la disponibilidad de metales (Leduc *et al*, 2008).

El FAs reveló un bajo valor en la menor concentración (1,2), y mucho menor aún en la mayor concentración ya que su valor fue menor a la unidad. Por lo tanto, solo una pequeña cantidad del metal contenido en el sustrato (sedimento-alimento) fue absorbida a través del intestino de las larvas. Por otro lado, los FCa fueron altos, y se encontró también el mayor valor en la menor concentración de Cu expuesta. Así, en ambos factores se detectó una relación inversa entre el factor y la concentración del Cu expuesta. Si bien, los valores de los FCa fueron muy altos en relación a los FAs, la

comparación entre ambos no es posible, debido a que la entrada del Cu en las larvas es diferente. Los FCA difieren de los FAs, en que la ruta de entrada de los tóxicos en los organismos resulta únicamente desde el agua, mientras que en el segundo caso, resulta de todas las posibles rutas de entrada de exposición (como el sedimento y alimento). De esta manera, los resultados demuestran, que el Cu en el agua pudo estar presente en forma más biodisponible para las larvas, y pudo ser acumulado directamente desde el agua a través de la absorción principalmente del tegumento. La mayor acumulación del Cu en larvas de *C. gr. decorus* a través del agua, coincide con los estudios de Kosalwat y Knight (1987a). Ellos expusieron larvas del 4° estadio a semejantes concentraciones de Cu en medio acuoso y también larvas a concentraciones mayores en un sustrato compuesto por alimento para peces. Los resultados evidenciaron que el Cu estuvo ligado al sustrato y solo una pequeña porción fue asimilada mediante el intestino, ya que la mayor parte del Cu, estaba unido a las heces y alimento no digerido en el intestino. Otro estudio, reveló para una variedad de organismos (entre ellos quironómidos) y metales (As, Cd, Cu, Pb, Hg, Zn, entre otros) relaciones inversas entre los factores de bioacumulación en agua y las concentraciones expuestas (DeForest *et al.*, 2007). La entrada del Cu en las larvas de este género a través del agua, se relaciona con la naturaleza de la cubierta del cuerpo, ya que es relativamente fina y facilita la penetración del metal (ya sea por difusión pasiva o activa) (Sarkar, 1981; Franklin *et al.*, 2002). Las relaciones inversas entre los factores analizados y las concentraciones expuestas de Cu registradas en este estudio, al igual que los hallados por los autores mencionados, pueden ser explicadas por la siguiente hipótesis: Los organismos son capaces de acumular y regular el metal (Cu en este caso) en sus cuerpos hasta un “umbral de concentración saturable”. Por el contrario, cuando son expuestos por encima de este umbral, y la regulación se satura, el nivel del metal en el cuerpo aumentaría en proporción a la concentración externa, resultando en efectos adversos o letales para los organismos. Esto coincide con los resultados obtenidos también por White y Rainbow (1982), para el camarón *Palaemon elegans* y el Cu.

Por lo expuesto, los resultados aportados en este estudio permitieron aceptar las hipótesis planteadas, debido a la ausencia de evidencias para rechazarlas. En relación a la capacidad de acumulación de Cu en sus tejidos, los resultados indican que la bioacumulación del Cu a través del sustrato en *C. gr. decorus* no fue un buen indicador

desde esta ruta, porque fue el sedimento el principal compartimento acumulador del Cu, mientras que si puede ser considerado un buen acumulador de Cu del medio acuoso En relación a la segunda hipótesis, se registraron mayores alteraciones en el ciclo de vida y malformaciones con el aumento de concentración de Cu pero no del Cr.

# Capítulo 3

---

## **Toxicidad y bioacumulación del cromo** **en *Limnodrilus udekemianus* (Oligochaeta, Naididae)**

Escala microcosmos y mesocosmos

---

**Capítulo 3: Toxicidad y bioacumulación del cromo en *Limnodrilus udekemianus* (Oligochaeta: Naididae). Escala microcosmos y mesocosmos.****3.1. Introducción**

Los oligoquetos dulceacuícolas bentónicos son considerados desde hace décadas por numerosos autores como buenos indicadores de calidad ambiental debido a características particulares, fundamentalmente por sus hábitos alimenticios (son consumidores de detritos), escasa movilidad, ciclo de vida completo en el mismo ambiente, por lo que pueden responder a los efectos de la contaminación intermitente durante el período de estrés, para recobrar su estructura poblacional inmediatamente después del cese de la contaminación. Además, participan en los procesos de bioturbación entre el agua y el sedimento, acelerando la liberación de compuestos a través de un proceso mecánico como la remoción del sedimento y la formación de galerías. Su ocurrencia en los sedimentos de fondo tanto en condiciones contaminadas como no contaminadas ha sido bien documentada a nivel mundial (Brinkhurst, 1980; Milbrink, 1994; Lafont, 1984; Lang, *et al.*, 1989; Hellowell, 1986; Plafkin, *et al.*, 1989; Rosenberg y Resh, 1993; Marchese 1997; Chapman 2001; entre otros).

Al respecto, como fue desarrollado en el capítulo 1, los oligoquetos fueron un grupo clave junto a los quironómidos en los ensambles bentónicos de los ambientes estudiados del río Salado del Norte, en los cuales se registraron altas concentraciones de Cr (entre otros metales), en agua y sedimentos de fondo. Por lo tanto, resultó de interés estudiar las respuestas principalmente subletales de los oligoquetos en sedimentos contaminados con Cr, expuestos a condiciones controladas de laboratorio, para poder complementar los estudios realizados en campo y analizar la posibilidad de usar a estos organismos como bioindicadores. Los oligoquetos, al vivir con sus cabezas introducidas hacia abajo dentro del sedimento y su parte posterior hacia arriba, sobresaliendo generalmente en la interfase sedimento-agua, adonde excretan las heces, están expuestos de esta manera a los contaminantes tanto a través de la alimentación por las partículas del sedimento que ingieren, como por el contacto corporal con el agua intersticial y circundante. Como resultado de su dominancia en las comunidades bentónicas de grandes lagos, de ríos en la zona potámica y lagunas de ríos con llanura aluvial y su importancia en las tramas tróficas, ellos están particularmente bien adaptados para su uso en estudios de bioacumulación y biomagnificación (Reynoldson, *et al.*, 1991; Ankley *et al.*, 1992; Phipps *et al.*, 1993; Egeler *et al.*, 2004; Leduc *et al.*, 2008). Pueden ser utilizados, asimismo en test de toxicidad, los que incluyen efectos de los tóxicos sobre

distintos aspectos de la biología de estos organismos: supervivencia, crecimiento, reproducción, comportamiento, etc. Así, Patrick y Loutit (1978), han demostrado que los metales como el Cr, Cu, Mn, Fe, Pb y Zn pueden pasar a través de la trama trófica desde los oligoquetos a los peces. Por lo tanto, los oligoquetos poseen un rol importante en el ciclo de los metales y compuestos orgánicos asociados a los sedimentos de fondo debido a que pueden procesar considerable cantidad de tóxicos resultando de relevante interés como indicadores biológicos (Burton, 1991; Rodríguez y Reynoldson 1999).

La literatura disponible sobre oligoquetos acuáticos continentales y tóxicos está principalmente basada en estudios de contaminantes orgánicos (Ankley *et al.*, 1992; Leppänen y Kukkonen, 2000; Van Hoof *et al.*, 2001; Egeler *et al.*, 2004; Hyötyläinen y Oikari, 2004; Croce *et al.*, 2005, entre otros) o con metales como el Cd, Cu, Pb, Hg y Zn (Chapman *et al.*, 1980; Klerks y Bartholomew, 1991; Phipps *et al.*, 1993; Bervoets *et al.*, 1997; Deeds y Klerks, 1999; Lucan-Bouché *et al.*, 1999; Winger *et al.*, 2000; Gillis *et al.*, 2004; Miño *et al.*, 2006). Contrariamente, en relación al Cr, existe poca información, pudiéndose citar estudios realizados en el campo (Wentsel *et al.*, 1977; Prygiel *et al.*, 2000), o en ensayos de toxicidad aguda (Broković-Popović y Popović, 1977; Khangarot, 1991; Penttinen *et al.*, 2008) utilizando especies de oligoquetos como: *Tubifex tubifex* y *Lumbriculus variegatus*.

*Limnodrilus udekemianus*, fue elegida como potencial bioindicador de la disponibilidad del Cr por ser una especie cosmopolita, muy común en ambientes dulceacuícolas del sistema del río Paraná (Marchese y Ezcurra de Drago, 1992; Ezcurra de Drago *et al.*, 2007), donde alcanza suficiente biomasa para los análisis de concentraciones de sustancia tóxicas en sus tejidos y por poseer alta tolerancia a las variaciones de las características físico-químicas del sedimento de fondo en el que vive. Además su ciclo de vida relativamente largo (entre 2-3 años) permite evaluar puntos finales en evaluaciones de toxicidad crónica (ej., reproducción, crecimiento, acumulación); permite ser expuesto a todas las rutas importantes de interés (columna de agua, agua intersticial e ingestión de partículas contaminadas del sedimento) y es de fácil cultivo y manejo en laboratorio. Estos organismos constituyen una importante fuente alimenticia para otros invertebrados acuáticos así como también para los peces bentónicos, por lo que pueden actuar potencialmente en la transferencia de los tóxicos a los niveles tróficos superiores.

Cabe señalar que en la literatura mundial, las especies de oligoquetos más comúnmente utilizadas en estudios ecotoxicológicos son *Lumbriculus variegatus* (Lumbriculidae) y *Tubifex tubifex* (Naididae). La primera es una especie recientemente introducida en lagos patagónicos y la segunda es muy poco abundante y ocasional en ambientes del río Paraná. Por otro lado, *Limnodrilus hoffmeisteri* (dominante en muchos ambientes) que ha sido propuesta y utilizada en algunos trabajos, en general no se la recomienda porque es difícil su manipulación ya que se enrolla en sí misma, mientras que su congénere *L. udekemianus* no tiene este comportamiento y es de mayor tamaño.

En cuanto a estudios sobre *L. udekemianus*, han sido realizados con Cd en laboratorio (Deeds y Klerks, 1999) y con sedimentos provenientes de lagos con diferentes grados de contaminación orgánica y mezcla de metales como Hg, Pb, Zn, Cd y Cu (Wiederholm *et al.*, 1987). Además, ha sido evaluado el efecto del herbicida Paraquat sobre el zooplancton y bentos (donde *L. udekemianus* formaba parte de la asociación de especies) por Gagneten y Marchese (2003).

### 3.2. Los objetivos e hipótesis del presente capítulo son:

#### **Objetivos**

- Evaluar el efecto del Cr sobre la supervivencia, reproducción, y la capacidad de bioacumulación y eliminación, en *L. udekemianus* expuesto a sedimentos contaminados en condiciones experimentales.
- Analizar a *L. udekemianus* como potencial bioindicador de contaminación por Cr en monitoreos ambientales.

#### **Hipótesis**

- ✓ El Cr afecta negativamente la reproducción de *L. udekemianus*.
- ✓ *L. udekemianus* presenta una alta capacidad de acumulación y eliminación de Cr.



### 3.3. Materiales y Métodos

#### 3.3.1. Experiencia 5: Efecto del Cr sobre la supervivencia y reproducción de *L. udekemianus*, en microcosmos.

##### *Obtención y aclimatación de los organismos*

Los organismos estudiados fueron obtenidos de un cultivo “stock” del Instituto Nacional de Limnología (CONICET-UNL), los cuales fueron colocados en un acuario de vidrio, en ambiente climatizado, por 2 semanas, hasta el inicio de la experiencia. El acuario contenía sedimento artificial, compuesto por arena, arcilla caolín y turba (OECD, 2004) para permitir la construcción de sus habitáculos y agua declorada y aireada continuamente. Se los mantuvo en oscuridad y fueron alimentados con comida balanceada para peces (Nutrafin®), dos veces por semana. Las principales características físicas y químicas del agua del acuario fueron: temperatura: 23 ( $\pm 2^\circ$  C), oxígeno disuelto: 7,8 ( $\pm 0,53$  mg l<sup>-1</sup>), dureza: 295 ( $\pm 30$  mg l<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>), conductividad: 1230 ( $\pm 64$  mS cm<sup>-1</sup>) y pH: 8,3 ( $\pm 0,12$ ).

##### *Diseño experimental*

La experiencia se llevó a cabo en las mismas condiciones del cultivo mencionadas anteriormente, en cuanto a temperatura, oscuridad, aireación y tipo de sedimento. Los recipientes utilizados (1,5 l) contenían una fina capa de sedimento artificial (40g de peso seco) y la solución (1l). La calidad del agua testada fue similar a la perteneciente a los tributarios de la margen derecha del río Paraná Medio (Marchese y Ezcurra de Drago, 1983; Bertoldi de Pomar *et al.*, 1986).

##### *Preparación del sedimento enriquecido con Cr y condiciones de los tratamientos*

Organismos sexualmente maduros (clitelo desarrollado) de *L. udekemianus* fueron expuestos a 2 concentraciones de Cr y el control, las cuales fueron elegidas teniendo en cuenta datos de concentraciones de Cr registradas en campo (Gagneten *et al.*, 2007; Marchese *et al.*, 2008a y datos del capítulo 1) y de ensayos agudos PROBIT (96h-LC<sub>50</sub>) para esta especie (1,52 mg l<sup>-1</sup> Cr) según Ulloa Campos (2000).

Las concentraciones fueron preparadas utilizando una solución stock de Cr con sal de calidad analítica (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) y agua Milli-Q. Las mismas fueron al día “0”: 0,3 mg l<sup>-1</sup> Cr (en agua) y 15,6 mg kg<sup>-1</sup> Cr (peso seco, en sedimento) en el tratamiento 1 (T1) y 1 mg l<sup>-1</sup> Cr

(agua) y  $24,3 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Cr}$  (sedimento) en el tratamiento 2 (T2), además del control, en las mismas condiciones pero sin la adición de Cr. Cada tratamiento fue realizado con 6 réplicas. El sedimento contaminado de las concentraciones elegidas fue preparado mediante la adición de la solución testada directamente al sedimento de cada recipiente, luego se agregó el agua de clorada cuidadosamente para evitar disturbios en la superficie del sedimento (según OECD, 2004). El sistema test permaneció 48 horas para permitir la partición del Cr entre el agua y el sedimento. Luego de este período (día 0), se agregaron 15 oligoquetos (adultos, de tamaño semejante) que fueron distribuidos aleatoriamente en cada recipiente. Los organismos fueron alimentados al inicio de la experiencia con Nutrafin® y la duración de la exposición fue de 28 días (según Reynoldson *et al.*, 1991). Los materiales utilizados en la experiencia fueron previamente lavados con 2N HNO<sub>3</sub>. Todos los reactivos fueron de grado analítico y las soluciones usadas fueron preparadas con agua Milli-Q.

#### *Mediciones físicas y químicas*

Durante la experiencia, en cada réplica se midió diariamente la temperatura y el oxígeno disuelto (YSI 55), y el pH fue chequeado dos veces por semana (Horiba U10 check water). La dureza total fue analizada por método titrimétrico según APHA (1998) al principio y al final de la experiencia.

La preparación del sedimento y las determinaciones de temperatura, pH y OD en los diferentes tratamientos fueron realizadas por la tesista, mientras que la determinación de dureza fue realizada por personal del INALI.

#### *Análisis de los datos*

Al finalizar el período de exposición, los organismos fueron separados del sedimento, se contaron aquellos sobrevivientes y se conservaron en etanol (al 70%), hasta el montaje en microscopio para determinar su estado reproductivo (400x). La reproducción fue determinada mediante el número de juveniles producidos por los adultos en cada réplica (tasa: juveniles/adultos), según Marchese y Brinkhurst (1996).

#### *Análisis estadísticos*

Los análisis estadísticos de los datos consistieron en el Análisis de la Varianza (ANOVA one-way), seguido del test de comparación múltiple de Tukey para determinar las diferencias significativas en los parámetros físico-químicos, la supervivencia larval y las tasas

de juveniles/adultos, entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, y las transformaciones de los datos, así como el software utilizado, fueron los mismos que los mencionados para el capítulo anterior.

### 3.3.2. Experiencia 6: Acumulación y eliminación de Cr por *L. udekemianus*, en mesocosmos.

#### *Obtención y aclimatación de los organismos*

Los ejemplares de *L. udekemianus* se obtuvieron a partir de material disponible en el mercado como alimento para peces y fueron aclimatados en acuarios de vidrio en laboratorio. Las características del acuario y de la aclimatación son las mismas a las comentadas para la experiencia 5, salvo que en esta oportunidad el periodo de aclimatación se extendió a un mes para asegurar además una depuración.

#### *Diseño experimental*

Para entender el complejo sistema ecológico, se intentó reproducir un modelo con características que simulen la estructura y funcionamiento de los sistemas naturales. Se utilizó para ello un “sistema de mesocosmos estático”, el cual fue ubicado al aire libre (31°39'56,51" S-60°45'21,19" O) durante la primavera (Fig. 3.1). Una experiencia preliminar fue realizada para optimizar las condiciones definitivas de esta experiencia, ej., cantidad de organismos, duración de la fase de acumulación y eliminación, etc.

Si bien la investigación se realizó en conjunto con otros investigadores del INALI y de la FHUC (UNL), con el fin de investigar la capacidad de acumulación y eliminación del Cr por cuatro especies simultáneamente (las plantas acuáticas sumergidas: *Ceratophyllum demersum*; cangrejos decápodos: *Zilchiopsis collastinensis*; peces: *Cnesterodon decemmaculatus* y oligoquetos: *L. udekemianus*), en este manuscrito se detallarán únicamente los resultados obtenidos con la citada especie de oligoquetos.

El mesocosmos se llevó a cabo en 6 tanques de PVC, de 1.000 l cada uno. Cada tanque contenía 130 kg de sedimento artificial (según OECD, 2004) y 800 l de agua declorada, aireada continuamente. En esta experiencia también la calidad del agua utilizada fue similar a la perteneciente a los tributarios de la margen derecha del río Paraná Medio.



Figura 3.1: Tanques experimentales (tratamientos) del mesocosmos.

#### *Preparación del sedimento enriquecido con Cr y condiciones de los tratamientos*

La solución stock y las concentraciones elegidas fueron las mismas a las empleadas en la experiencia 5 (referidas acá también como T1, T2 y control), pero en este caso fueron 2 réplicas por tratamiento debido al tamaño de los tanques del mesocosmos. El sedimento contaminado de las concentraciones elegidas también fue preparado mediante la adición de la solución testeada directamente al sedimento de cada tanque y se mezcló en forma manual. Luego se agregó el agua de cloración cuidadosamente para evitar disturbios en la superficie del sedimento. El sistema se dejó llegar al equilibrio durante 5 días y luego de este período (día 0), fueron distribuidos aleatoriamente en cada tanque 200 gramos de *L. udekemianus*, en estadio de adultos y de semejante tamaño (aproximadamente 3.500 organismos).

La duración de la experiencia fue dividida en dos etapas o fases: fase de acumulación (de 28 días) y fase de eliminación (de 7 días). Para esta última fase, los organismos se transfirieron a un tanque similar pero sin Cr, con sedimento artificial limpio y agua de cloración

y aireada, para analizar la concentración de Cr residual en agua, sedimentos y tejidos. En ambas fases, fueron alimentados con Nutrafin<sup>®</sup> semanalmente. Al final de la experiencia, los oligoquetos fueron colectados de los sedimentos y se mantuvieron en agua limpia durante 6 h para purgar su contenido intestinal. Luego se colocaron en una cápsula de aluminio, previa absorción del agua retenida por la pared del cuerpo con papel de filtro, secados a estufa hasta peso constante (microbalanza OHAUS) y congelados a -20 ° C hasta su posterior análisis.

#### *Mediciones físicas y químicas*

Se midió diariamente en cada tanque, al igual que en la experiencia anterior: temperatura, oxígeno disuelto, pH y además conductividad (Horiba U10 check wáter). También se analizó la dureza total y la concentración de amonio, ambas fueron medidas dos veces por semana por el método titrimétrico y colorimétrico, respectivamente (APHA, 1998).

En cada tanque se tomaron muestras de agua, sedimento y oligoquetos (pool de 2 a 4g), para la determinación del Cr total a los siguientes días de la fase de acumulación: 0, 1, 7, 14 y 28, y a los días: 1 y 7 de la fase de eliminación. Además, al día 14 y 28 de la fase de acumulación se extrajeron muestras de agua y sedimento de cada tanque para la determinación de Cr total en el agua intersticial, el TOC (carbono orgánico total) y AVS (sulfuros ácidos volátiles).

Para la determinación de Cr total en la columna de agua y en el agua intersticial, las muestras fueron tratadas de acuerdo a la US EPA (1991), según el método 200.2. El TOC fue obtenido por el método de combustión a alta temperatura (APHA, 1998) y el procedimiento del análisis del AVS fue realizado mediante el método descrito por Allen *et al.* (1993).

Para la determinación de Cr total en los sedimentos, las muestras fueron tratadas de acuerdo con la US EPA (1991), método 200.2. Por su parte, las muestras de tejido fueron digeridas de acuerdo a la US EPA (1991), método 200.3. Tanto en agua, sedimento como en tejidos, el análisis de Cr se realizó por espectrofotometría de absorción atómica (Perkin-Elmer AAnalyst 800, siendo su límite de cuantificación de  $3 \mu\text{g l}^{-1}$  y el límite de detección de  $1 \mu\text{g l}^{-1}$ ). En todos los casos, los materiales previamente a ser utilizados en la experiencia fueron lavados con  $\text{HNO}_3$  2N. Todos los reactivos y soluciones fueron preparados con agua ultrapura Milli-Q y los análisis de metales se realizaron por duplicado.

La preparación del sedimento, las determinaciones de los parámetros físicos y químicos en los diferentes tratamientos y las digestiones de las muestras de tejidos y sedimento para la determinación del Cr fueron realizadas por la tesista, miembros del equipo de investigación del Laboratorio de Ecotoxicología (FHUC-UNL) y del INALI. Las determinaciones por espectrofotometría de absorción atómica del Cr en todos los compartimentos estudiados fueron realizadas por personal del SECEGRIN del Centro Científico Tecnológico CONICET, Santa Fe. Las determinaciones de AVS fueron realizadas por personal del Laboratorio Central de INDUSER (Laboratorio de análisis químicos y microbiológicos, BsAs) y el TOC por personal del INTEC (CONICET-UNL).

#### *Análisis de los datos*

Para conocer la concentración de Cr en el tejido de *L. udekemianus* y su relación con el medio contaminado durante toda la experiencia, se realizaron los cálculos propuestos por Newman y Unger (2003), y Yap *et al.* (2004).

Se aceptó el supuesto de que el estado estacionario se alcanza a los 28 días de exposición, por lo que no se realizó el estudio cinético debido a que para la mayoría de los contaminantes, más del 80% del estado de equilibrio (“steady state”) entre el ambiente y el organismo es alcanzado en este período (ASTM, 1999; Ingersoll *et al.*, 2003). De todos modos se analizaron los factores que se detallan a continuación en diferentes fechas de la fase de acumulación.

-Factor de Bioconcentración (FBC):

$$FBC = \frac{C_e - C_i}{C_w}$$

donde:  $C_e$  = concentración de Cr en tejido ( $\text{mg kg}^{-1}$ , peso seco) durante la exposición,  $C_i$  = concentración de Cr en tejido ( $\text{mg kg}^{-1}$ , peso seco) antes de la exposición y  $C_w$  = concentración de Cr en agua ( $\text{mg l}^{-1}$ ). Ellos fueron calculados en ambas concentraciones a los 7, 14 y 28 días de exposición.

-Factor de Bioacumulación (FBAs):

$$FBAs = \frac{C_e - C_i}{C_s}$$

donde:  $C_e$  = concentración de Cr en tejido ( $\text{mg kg}^{-1}$ , peso seco) durante la exposición,  $C_i$  = concentración de Cr en tejido ( $\text{mg kg}^{-1}$ , peso seco) antes de la exposición, y  $C_s$  = concentración de Cr en sedimento ( $\text{mg kg}^{-1}$ , peso seco). Ellos también fueron calculados en ambas concentraciones a los 7, 14 y 28 días de exposición.

$$\text{-Tasa de acumulación del metal} = \frac{C_e - C_i}{T}$$

donde:  $C_e$  = concentración de Cr en tejido ( $\text{mg kg}^{-1}$ , peso seco) durante la exposición,  $C_i$  = concentración de Cr en tejido ( $\text{mg kg}^{-1}$ , pesos seco) antes de la exposición,  $T$  = día (s) de exposición al metal (realizados desde el día 1 al 28, para ambas concentraciones).

$$\text{-Porcentaje de eliminación del metal} = \frac{C_{ee} - C_{el}}{C_{ee} - C_i} (x100)$$

donde:  $C_{ee}$  = concentración de Cr en tejido ( $\text{mg kg}^{-1}$ , peso seco) al final de la exposición,  $C_{el}$  = concentración de Cr en tejido ( $\text{mg kg}^{-1}$ , peso seco) al final de la fase de eliminación,  $C_i$  = concentración de Cr en tejido ( $\text{mg kg}^{-1}$ , peso seco) antes de la exposición.

#### *Análisis estadísticos*

Los análisis estadísticos de los datos al igual que en la experiencia anterior, consistieron en el ANOVA y test de comparación múltiple de Tukey, para determinar las diferencias significativas en los parámetros físicos y químicos (incluyendo concentraciones de Cr en agua, sedimento y tejido), entre los tratamientos. Los datos en cuanto a los supuestos, transformaciones y software utilizado, fueron tratados como en el capítulo anterior.

### 3.4. Resultados

3.4.1. Experiencia 5: Efecto del Cr sobre la supervivencia y reproducción de *L. udekemianus*, en microcosmos.

#### *Calidad del agua*

En la tabla 3.1 se muestran las variables físicas y químicas analizadas durante los 28 días de exposición, sin encontrarse diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0,05$ ).

	<b>Control</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>
T°C	24,75 (±0,51)	24,80 (±0,45)	24,88 (±0,48)
OD (mg l <sup>-1</sup> )	5,20 (±0,29)	5,10 (±0,25)	5,11 (±0,18)
pH	8,05 (±0,11)	8,06 (±0,11)	8,05 (±0,11)
Dureza (mg l <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub> )	254,1 (±0,2)	252,0 (±0,6)	255,2 (±0,1)

Tabla 3.1: Variables físicas y químicas (media ± SD) medidas durante los 28 días de exposición. T1: 15,6 mg kg<sup>-1</sup> Cr, T2: 24,3 mg kg<sup>-1</sup> Cr. Estas referencias se repiten en las siguientes figuras. N: 63 por tratamiento.

#### *Supervivencia*

El porcentaje promedio de supervivencia fue 93,3% en el control, mientras que en las concentraciones de Cr se registró en promedio 82,7%. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0,05$ ) (Fig. 3.2).



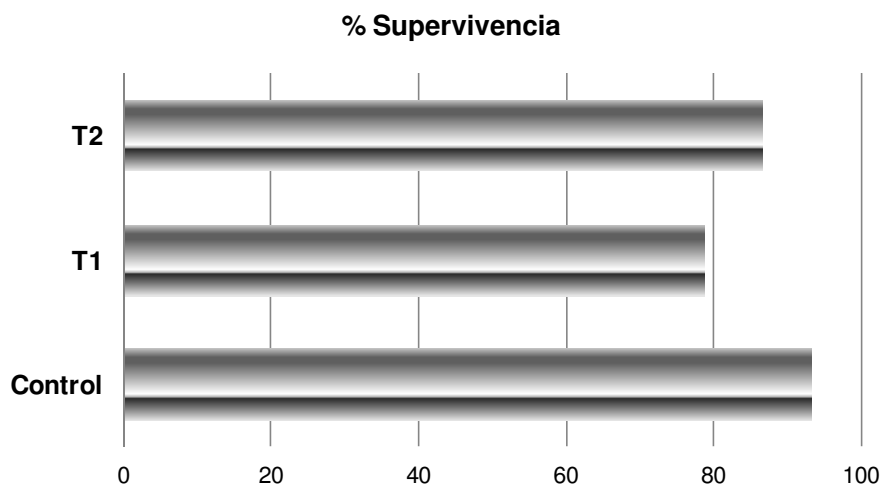


Figura 3.2: Porcentaje de supervivencia de *L. udekemianus* por tratamiento durante los 28 días de exposición. N: 6 réplicas.

### Reproducción

La tasa de reproducción fue baja tanto en el control como en las concentraciones con Cr, obteniéndose una relación juveniles/adultos de, control: 0,10 ( $\pm$  0,09); T1: 0,09 ( $\pm$  0,08) y T2: 0,10 ( $\pm$  0,10), sin encontrarse diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0,05$ ). En la Fig. 3.3, se observan los números de juveniles y adultos encontrados al final de la experiencia. En relación a los adultos, la mayoría de ellos fueron inmaduros, y los pocos organismos sexualmente maduros registrados (con presencia de la vaina penial) pertenecieron al control y T2.

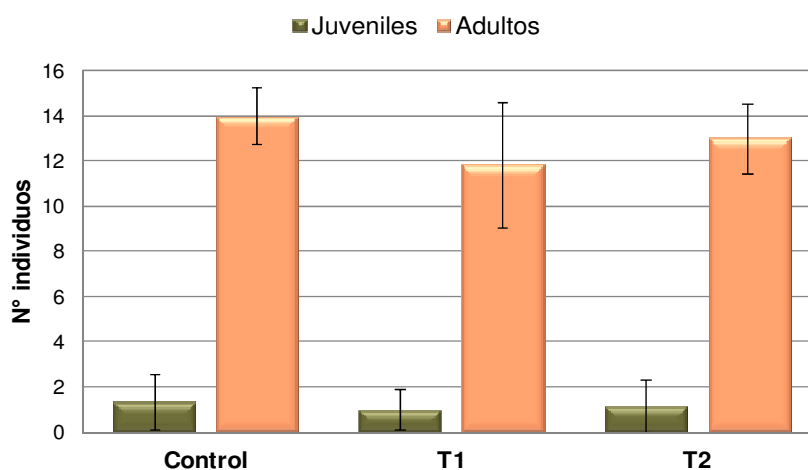


Figura 3.3: Número de adultos y juveniles (media  $\pm$  SD) de *L. udekemianus* por tratamiento, durante los 28 días de exposición.

3.4.2. Experiencia 6: Acumulación y eliminación de Cr por *L. udekemianus*, en mesocosmos.

*Características del agua y sedimento*

La tabla 3.2 muestra las variables físicas y químicas medidas durante toda la experiencia. Las concentraciones de las diferentes variables analizadas en cada fase, no fueron significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) entre los tratamientos con respecto al oxígeno disuelto, temperatura, conductividad, pH, dureza, TOC y AVS. Mientras que se encontraron diferencias significativas en cuanto al amonio en el control de la fase de acumulación, que fue menor a la de ambas concentraciones testeadas.

	Fase de <b>Acumulación</b>			Fase de <b>Eliminación</b>		
	<b>Control</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>Control</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>
Oxígeno Disuelto (mg l <sup>-1</sup> )	9,0 (±0,95)	8,9 (±0,78)	8,9 (±0,84)	7,4 (±0,05)	7,8 (±0,44)	7,8 (±0,53)
Temperatura (°C)	17,8 (±2,66)	17,5 (±2,42)	17,6 (±2,41)	21,4 (±1,98)	21,4 (±1,37)	21,6 (±1,24)
Conductividad (µS cm <sup>-1</sup> )	1 244 (±69)	1 219 (±45)	1 233 (±64)	1 470 (±70)	1 470 (±50)	1 480 (±62)
pH	8,3 (±0,13)	8,3 (±0,12)	8,3 (±0,12)	8,4 (±0,05)	8,4 (±0,09)	8,4 (±0,09)
Dureza (mg l <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub> )	320,1 (±35,9)	295,2 (±53,8)	290,9 (±30,2)	281,5 (±5,7)	307,2 (±51,9)	317,8 (±38,2)
TOC (mg l <sup>-1</sup> )	6,6 (±0,81)	6,4 (±0,70)	5,8 (±1,09)	nd	nd	nd
Amonio (mg l <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> -N)	0,65 (± 0,09)	1,34 (±0,59)	1,43 (±0,73)	0,47 (±0,17)	0,42 (±0,17)	0,57 (±0,18)
AVS (mg kg <sup>-1</sup> )	<1,0 (±0,00)	<1,0 (±0,00)	<1,0 (±0,00)	nd	nd	nd

Tabla 3.2: Variables físicas y químicas (medias ± SD) registradas en agua (excepto el AVS en sedimento) durante las fases de acumulación y eliminación, en todos los tratamientos (nd: no determinado). T1: 15,6 mg kg<sup>-1</sup> Cr, T2: 24,3 mg kg<sup>-1</sup> Cr. Estas referencias se repiten en las siguientes figuras.

Concentración de Cr en tejido de oligoquetos y relación con su medio

La concentración de Cr en el agua intersticial fue baja en todos los tratamientos durante la fase de acumulación, sólo en el T2 se registró un valor superior al límite de cuantificación (0,006 mg l<sup>-1</sup> Cr).

Los resultados de las concentraciones de Cr en la columna de agua, sedimento, así como en tejido de *L. udekemianus* durante toda la experiencia se muestran en la Fig. 3.4. Con respecto al control, a lo largo de toda la experiencia, no se registraron diferencias significativas en la concentración del Cr en cada uno de los compartimentos (p>0,05).

Durante la fase de acumulación, tanto en la columna de agua como en sedimento, se registraron diferencias significativas (p<0,05) en las concentraciones de Cr entre todos los tratamientos, siendo mayores en T2. Por otra parte, en los oligoquetos sólo se obtuvieron diferencias significativas entre el control y ambas concentraciones, pero no entre ellas. La concentración de Cr en oligoquetos durante la fase de acumulación incrementó rápidamente, alcanzando los valores máximos al día 14 (68,5 y 74,5 mg kg<sup>-1</sup> Cr, en T1 y T2, respectivamente), luego disminuyó hacia el final de esta fase (día 28), indicando que el estado de equilibrio sería alcanzado antes de los 28 días de exposición.

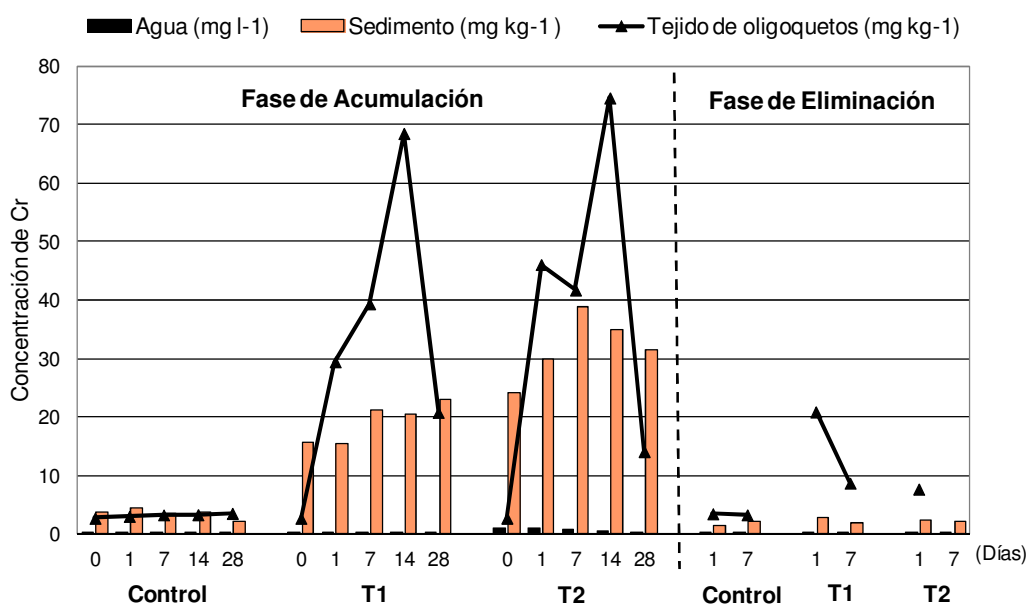


Figura 3.4: Concentración de Cr total durante las fases de acumulación y eliminación, en columna de agua (mg l<sup>-1</sup>), sedimento (mg kg<sup>-1</sup>, peso seco) y tejido de oligoquetos (mg kg<sup>-1</sup>, peso seco), en todos los tratamientos.

Los resultados de los cálculos del FBC y FBAs se ilustran en la Fig. 3.5. En ambos factores podemos destacar que se registró una relación inversa entre ellos y las concentraciones de Cr expuestas, ya que los mayores valores se alcanzaron en el T1. Mientras que en ambos factores, se registraron los máximos valores al día 14. Los FBC fueron altos, propio de la escasa concentración del Cr en agua. Los máximos valores registrados al día 14 fueron: 188 en T1 y 119,7 en T2. Sin embargo en el T1 hacia el final de la fase de acumulación (día 28) no se registró una disminución significativa de la concentración de Cr, mientras que sí sucedió en T2. Por su parte, los FBAs obtenidos al día 14 fueron: 3,2 en T1 y 2,05 en T2, y al igual que se observó en la Fig. 3.4, en ambas concentraciones no se registró acumulación posterior del Cr al día 28, ya que los valores de los FBAs fueron menores a la unidad, evidenciando que los organismos alcanzarían el estado de equilibrio entre los 14 y 28 días de exposición.

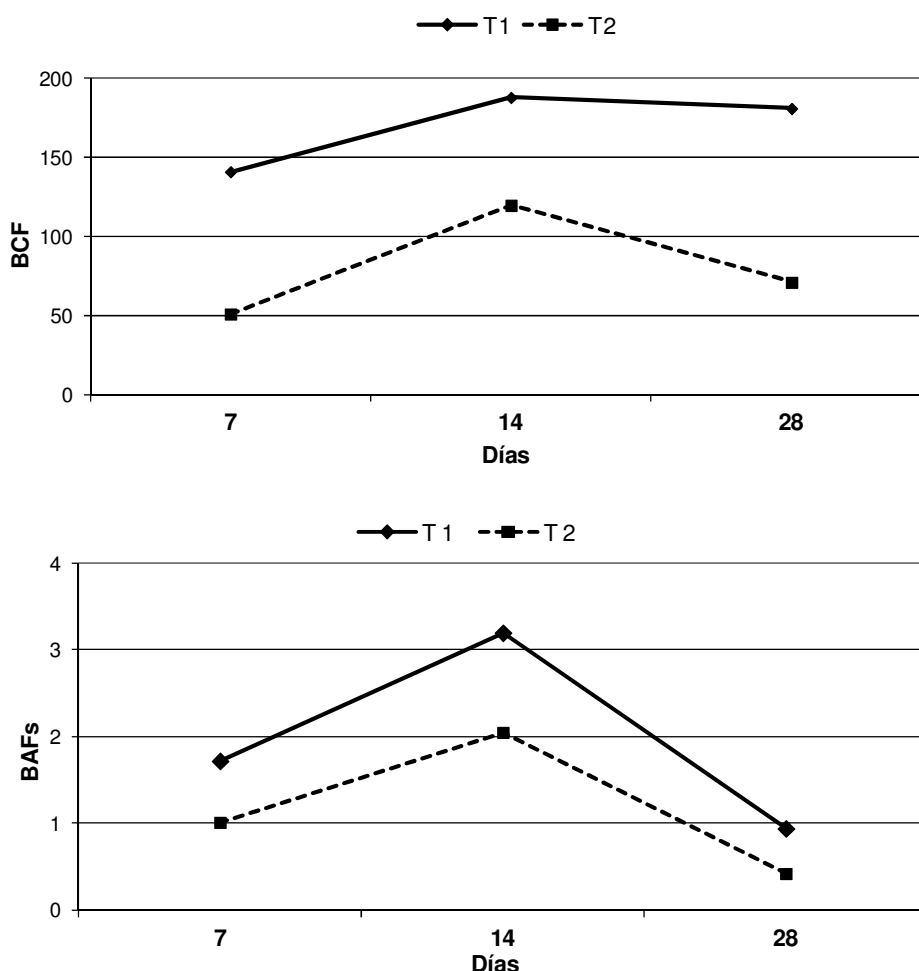


Figura 3.5: Factor de Bioconcentración (FBC) y Factor de Bioacumulación (FBAs) en *L. udekemianus* para ambas concentraciones estudiadas, durante la fase de acumulación.

Las Tasas de Acumulación del Cr en los tejidos de *L. udekemianus* (Fig. 3.6) fueron muy semejantes en ambas concentraciones durante toda la fase de acumulación, a excepción de la tasa al día 1 que fue significativamente mayor en el T2, aunque en ambas concentraciones se registraron los máximos valores en esta fecha, indicando la rapidez con que el Cr fue incorporado por los oligoquetos. Luego hacia el final de la exposición también queda reflejada la escasa acumulación por parte de dichos organismos.

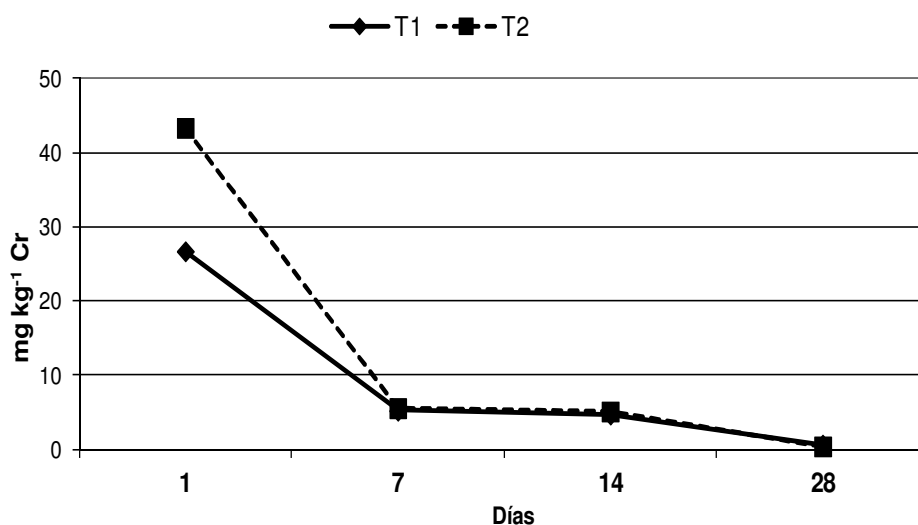


Figura 3.6: Tasas de acumulación del Cr en *L. udekemianus*, en ambas concentraciones estudiadas (mg kg<sup>-1</sup>, peso seco por día).

Durante la fase de eliminación (Fig. 3.4), las concentraciones de Cr en la columna de agua y en el sedimento no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0,05$ ), mientras que en los tejidos de oligoquetos, se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el control y ambas concentraciones. El Cr en los oligoquetos durante esta fase disminuyó hacia el final de la exposición para ambas concentraciones, siendo los porcentajes del metal eliminado: 67 y 56% en el T1 y T2, respectivamente.

### 3.5. Discusión

Los metales como el Cr son contaminantes peligrosos en ambientes acuáticos debido a su persistencia y elevada toxicidad para muchos organismos que habitan en ellos. Las rutas de entrada de los contaminantes en los oligoquetos acuáticos son básicamente semejantes a las comentadas por los quironómidos (capítulo precedente). Los contaminantes disueltos tanto en el agua intersticial como en la columna de agua, ingresan al organismo principalmente a través del tegumento. Otra ruta de entrada es con la ingestión de alimento contaminado o partículas del sedimento con el siguiente transporte a través del sistema digestivo. Por lo tanto el destino posterior del metal incorporado dependerá de la biodisponibilidad, de la concentración así como de la fisiología particular del organismo. Dicho metal podrá ser usado para un proceso metabólico esencial (como es el caso de los metales esenciales), excretado, almacenado en el cuerpo ó ejercer efectos tóxicos (Simkiss y Taylor, 1989).

Como ha sido documentado desde hace años, los oligoquetos, son considerados tolerantes a altas concentraciones de metales. Así Leduc *et al.* (2008), reportaron que el oligoqueto terrestre *Eisenia fetida*, toleró concentraciones de Cr que alcanzaron  $89 \text{ mg kg}^{-1}$  Cr, sin afectar su supervivencia. En cuanto a los oligoquetos acuáticos, Brokovic-Popovic y Popovic (1977) y Khangarot *et al.* (2003), realizaron experiencias de toxicidad aguda con metales (entre ellos el Cr) en *Tubifex tubifex* y encontraron altos valores de  $\text{LC}_{50}$  (48hs) con Cr ( $4,6$  y  $13,8 \text{ mg l}^{-1}$  Cr, respectivamente). Mientras que Reynoldson *et al.* (1996), en ensayos agudos y subletales también con *T. tubifex*, obtuvieron valores del  $\text{LC}_{50}$  (48hs) para el Cr, mayores a los registrados por los autores citados anteriormente ( $33$  a  $54,5 \text{ mg l}^{-1}$  Cr), indicando amplia tolerancia de la especie. Sin embargo estas grandes variaciones encontradas en la diferentes experiencias, si bien fueron con la misma especie, como fue mencionado en el capítulo precedente, pudo deberse a diferentes características físicas y químicas del medio testado (alcalinidad, pH, temperatura, etc.), como así también de la propia especie (variabilidad genética, edad de los organismos, etc.), lo que dificulta la conclusión con respecto a la tolerancia al Cr. Por otro lado, la tolerancia de los organismos testados en forma aislada de competidores y depredadores no es la misma que la tolerancia de una comunidad interactuando, por lo que resulta difícil extrapolar los resultados de laboratorio. Sin embargo los bioensayos complementan los estudios de campo y siguen siendo la única forma de dar respuesta a los interrogantes de causa-efecto, por lo que son de gran utilidad al evaluar poluentes específicos.

Este estudio proporcionó evidencias de que *Limnodrilus udekemianus* tiene la capacidad de acumular el metal según las concentraciones testeadas, lo que permite considerarlo como un buen bioindicador de ambientes contaminados por Cr. El papel que cumple esta especie en la transferencia de metales desde los sedimentos a niveles tróficos superiores es potencialmente significativo, debido a que alcanza abundante biomasa en las comunidades bentónicas y constituye un recurso importante en la dieta de los peces principalmente.

Con respecto a la reproducción en oligoquetos acuáticos, Reynoldson *et al.* (1996), expusieron a *T. tubifex* a sedimentos contaminados con metales (Cr entre ellos), y hallaron altos valores de la tasa juveniles/adultos ( $19 \pm 4,6$  y  $30,6 \pm 2,3$ ) en comparación a los resultados obtenidos aquí, donde fueron muy bajas. Sin embargo, dicha comparación no resulta adecuada, si tomamos en cuenta que la experiencia estuvo realizada con sedimentos que contenían una “mezcla” de metales, donde juegan un rol importante los sinergismos o antagonismos entre ellos. Por otro lado, Marchese (1997), realizó experiencias con sedimentos no contaminados (río Correntoso, cauce secundario del río Paraná) y sedimentos contaminados por desagües cloacales, principalmente (río Santa Fe, cauce secundario del río Paraná) y obtuvo en los sedimentos no contaminados para *Branchiura sowerbyi* una relación juveniles/adultos de  $0,5 (\pm 0,2)$  y de  $3,7 (\pm 0,5)$  para *Limnodrilus hoffmeisteri*; mientras que en el sedimento contaminado, ninguna de las especies logró reproducirse. En relación a *L. udekemianus*, Wiederholm *et al.* (1987), expusieron a esta especie a sedimentos de ambientes eutróficos y contaminados con metales (Hg, Cd, Pb, Zn y Cu) y los resultados demostraron su alta tolerancia, dado que la supervivencia fue total, pero la reproducción fue notablemente disminuida en relación al control así como respecto a otras especies (como *T. tubifex*).

En este estudio, si bien la tasa de reproducción fue muy baja tanto en el control como en las concentraciones analizadas, al final de la experiencia quedaron adultos aún reproduciéndose en todos los tratamientos, con un número ligeramente mayor en el control. Estos resultados indican un tiempo de reproducción y liberación de ootecas más largo en el control, en relación a las concentraciones. Las diferencias en relación a estos resultados, si se extrapolan al campo, serían básicamente un mayor incremento en la densidad de la población libre de Cr (organismos del control) porque durante mayor tiempo puede reproducirse y por consiguiente producir mayor cantidad de ootecas. El hecho que se hayan registrado adultos mayormente inmaduros en el presente trabajo se explica por las características del ciclo de

vida de estos organismos. En general el ciclo de vida de individuos del género *Limnodrilus* dura uno a dos años, alcanzando la primera madurez sexual entre los 7 y 9 meses. Luego de reproducirse, la mayoría de los individuos muere, pero otros reabsorben sus órganos sexuales, volviendo al estado de adultos inmaduros, desarrollando nuevamente sus órganos sexuales y reproduciéndose a los 2-4 meses más tarde (Kennedy, 1966; Poddubnaya, 1980; Marchese obs. pers.).

En relación a la experiencia de acumulación en mesocosmos, los valores de AVS obtenidos, se encontraron por debajo de los límites de detección analítica ( $<1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Los AVS, interactúan con los metales formando sulfuros insolubles y estables que hacen a los metales biológicamente inmóviles. Además, los AVS pueden cambiar el estado de oxidación de los metales, modificando su toxicidad. Sin embargo, los valores registrados indican que el Cr no estaba inmovilizado en forma de sulfuros. Resultados similares encontraron Berry *et al.* (2004), cuyas concentraciones de AVS en los sedimentos testeados no fueron significativamente mayores a cero, y las concentraciones de Cr en el agua aumentaron considerablemente, produciendo alta mortalidad de los anfípodos *Ampelisca abdita*.

La dureza y conductividad, si bien fueron altas, propia de la calidad del agua de los tributarios de la margen derecho del río Paraná Medio (como es el río Salado), permitió la biodisponibilidad del Cr para ser acumulado por los oligoquetos durante los 28 días de exposición. En cuanto al amonio, si bien su concentración fue alta, debido a la excreción de los organismos testeados en simultáneo, fue menor a la concentración letal ( $21,4 \text{ mg l}^{-1}$ ) reportada para invertebrados bentónicos según Schubauer-Berigan *et al.* (1995).

Muchos metales disueltos también pueden ligarse a la materia orgánica formando complejos que no permitirían la disponibilidad del metal (Bergman y Dorward-King, 1997). Sin embargo cuando los metales asociados a la materia orgánica ingresan a los organismos, pueden volverse disponibles durante el proceso digestivo (Prygiel *et al.*, 2000). La concentración de Cr registrada en los tejidos de *L. udekemianus* durante la fase de acumulación fue alta en ambos sedimentos contaminados, indicando que esta especie es capaz de acumular el Cr, participando de esta manera en la dinámica del metal.

Así las mayores concentraciones halladas en sus tejidos ( $68,5$  y  $74,5 \text{ mg kg}^{-1}$  Cr en T1 y T2, respectivamente), presentan valores entre 30 veces mayores a los registrados al comienzo de la experiencia, indicando su capacidad como acumulador de Cr. En



consecuencia, la medición de las concentraciones de Cr en el tejido biomonitor de *L. udekemianus* permitiría reflejar la biodisponibilidad del metal en el ambiente. En coincidencia con Ingersoll *et al.* (2003), el patrón de acumulación indicaría que el estado estacionario (“steady state”), fue alcanzado por los oligoquetos durante los 28 días de exposición en ambas concentraciones.

En cuanto a *L. udekemianus* y ambos factores analizados, los valores de los FBAs fueron mucho menores a los FBC, pero como fue explicado en el capítulo anterior, la extrapolación de los valores de FBC a otros compartimentos ambientales como es el sedimento no es posible, porque la concentración de los tóxicos en los organismos resulta de distintas rutas de entrada. Los resultados del análisis de ambos factores refleja la biodisponibilidad del Cr y acumulación efectiva por la especie citada. Sin embargo, al igual que lo registrado en los quironómidos del capítulo 2, también aquí encontramos relaciones inversas entre los factores y las concentraciones expuestas, como resultado de la mayor retención del Cr por el medio (agua y sedimento) en T2, pero en este caso las concentraciones del Cr en los tejidos de los oligoquetos en T1 y T2 fueron semejantes. Esto último indicaría la regulación del metal por parte de los organismos, ya que no se registró acumulación significativamente mayor de Cr en los tejidos expuestos a la mayor concentración. En relación a otras especies de oligoquetos acuáticos, no existe información hasta el momento de estudios con Cr, y es de esperar que los metales difieran entre sí en relación a la bioacumulación y así como entre las distintas especies o géneros. Por su parte, Leduc *et al.* (2008), registraron bioacumulación de hasta 49 mg kg<sup>-1</sup> Cr, en el oligoqueto terrestre *E. fetida*, como resultado a la exposición de lixiviados cromados, siendo los FBAs semejantes al presente estudio (entre 0,36 a 2,41).

En relación a la capacidad de acumulación de *L. udekemianus* con respecto a las demás especies analizadas en simultáneo, en la experiencia de mesocosmos, se registraron los mayores FBC en *C. demersum* (718,6) y en *L. udekemianus* (188), mientras que *Z. collastinensis* y *C. decemmaculatus* presentaron los menores valores (67,7 y 23,1, respectivamente) (Marchese *et al.*, 2008b), por lo que quedaría sintetizado de la siguiente manera: macrófitas > oligoquetos > crustáceos-decápodos > peces. Para usar un organismo en biomonitoreos acuáticos y así poder determinar variaciones de la concentración del metal ya sea temporal o espacial en un sistema acuático, el conocimiento del patrón de acumulación usado por el organismo elegido para ese metal es determinante. El biomonitor debe ser un

acumulador neto del metal en cuestión, preferentemente un “fuerte acumulador”, que aumente el poder de resolución entre los diferentes sitios (Rainbow, 2002). De esta manera, *L. udekemianus* mostró ser un buen acumulador de Cr entre las especies analizadas, y puede ser un buen biomonitor para analizar nuestros ambientes.

Si bien en este trabajo no se pretenden dilucidar los mecanismos de regulación de *L. udekemianus*, es conocido que en los oligoquetos, como ha sido reportado por varios autores, existen mecanismos de detoxificación para el exceso del metal. Entre ellos Honeycutt *et al.*, (1995), demostraron en *E. fetida* que los metales pueden ser almacenados principalmente en el tracto digestivo y en las paredes del cuerpo. Por otra parte, en los oligoquetos acuáticos ha sido documentada la presencia de mecanismos de detoxificación, que permiten a los organismos acumular altos niveles de metales en sus tejidos, permitiéndoles sobrevivir y resistir en los ambientes contaminados. Es así, como en *L. hoffmeisteri* y *L. udekemianus*, los metales (como el Cd y Pb) son “secuestrados” y almacenados posteriormente en gránulos ricos en azufre, en células específicas llamadas “cloragocitos”, que constituyen el tejido cloragógeno, que cubre el tracto digestivo (Klerks y Levinton, 1989; Klerks y Bartolomé, 1991). Otro método de detoxificación en oligoquetos, es en *T. tubifex*, donde los metales son almacenados en la parte caudal del cuerpo, que luego son capaces de “perder” por un proceso de auto-amputación y adaptarse de esta manera a medios contaminados (Lucan-Bouché *et al.*, 1999). Finalmente ha sido registrado en *T. tubifex* y en ambas especies de *Limnodrilus* citadas anteriormente, la inducción por el Cd de “metalotioneinas” (MTs), proteínas de bajo peso molecular, cuya función también sería detoxificadora al unirse con el metal (Klerks y Bartolomé, 1991; Deeds y Klerks, 1999; Gillis *et al.*, 2004). Conocer estos mecanismos de regulación es importante ya que la toxicidad de un metal ocurre cuando la tasa del metal incorporado en el cuerpo excede la tasa combinada de excreción y detoxificación del metal biodisponible (Rainbow, 2002). Sin embargo hasta el momento no ha sido documentada la presencia de alguno de estos mecanismos en *L. udekemianus* en relación al Cr, dado que los estudios revisados en la bibliografía pertenecen a regiones con problemas relacionados al Cd, Cu, Hg y Zn principalmente, por lo que sería de gran utilidad para nuestra región en un futuro realizar estudios al respecto, ya que las rutas de detoxificación dependen de las propiedades físico-químicas del metal.

Luego de la fase de acumulación, los oligoquetos pudieron eliminar gran parte del Cr acumulado en sus tejidos. Esto fue observado cuando los organismos fueron transferidos al

agua limpia, y demostrado por los altos porcentajes de eliminación del metal (> 55%). Sin embargo a pesar de que estos organismos pudieran tener ciertos mecanismos de secuestro de metales, los 7 días de eliminación no fueron quizás suficientes para eliminar completamente el Cr de sus tejidos.

Los metales así acumulados en los tejidos de invertebrados bentónicos representan una fuente importante de tóxicos en la dieta de cangrejos, camarones, peces bentónicos, anfibios y aves (Woodward *et al.*, 1994). Farag *et al.* (1999) concluyeron en su investigación, que la ingestión de invertebrados contaminados con metales podría ser la principal ruta de exposición de metales para los peces. De todos modos si bien la acumulación del metal en la especie presa tiene el potencial de ser acumulado por el predador, la transferencia del metal será determinada no sólo por la cantidad del metal acumulado en la presa, sino por su propia fisiología (ej.: detoxificación), como también por la propia fisiología del predador (Rainbow, 2002).

Por lo expuesto, en relación a las hipótesis planteadas, se acepta la primera, debido a que la reproducción fue afectada por los sedimentos contaminados. Con respecto a la segunda hipótesis, es aceptada, ya que efectivamente esta especie tiene capacidad para acumular Cr y eliminarlo de sus tejidos. Sin embargo, debería repetirse la experiencia en un futuro con un período de la fase de eliminación mayor, para determinar si el Cr es eliminado completamente.

## IV. Conclusiones

---

#### **IV. CONCLUSIONES**

- Las concentraciones de metales y las variables físicas y químicas analizadas en agua y sedimentos de fondo en los tramos estudiados del río Salado del Norte, diferenciaron claramente el estado de calidad del agua del cauce principal respecto a la de la llanura de inundación de ambas zonas. No obstante, tanto la zona considerada de referencia (SJ) como la zona problema (E) presentaron altas concentraciones de metales. Por lo tanto, SJ no constituyó una adecuada zona de referencia. Las concentraciones de Cr, Cu y Pb en agua en todas las estaciones analizadas, fueron mayores a los estándares permitidos en Argentina e incluso en Canadá. En cuanto, a las concentraciones de los metales citados en sedimentos, si bien fueron altas, no superaron los estándares citados.
- El cauce principal estuvo caracterizado por una mayor conductividad, profundidad, dureza, pH, OD y porcentajes de arena en los sedimentos de fondo. Contrariamente, los ambientes de la llanura de inundación estuvieron caracterizados por mayores valores de DBO<sub>5</sub>, contenido de materia orgánica y arcilla en los sedimentos, así como de nutrientes.
- Las mayores concentraciones de metales en agua se registraron en el cauce principal, mientras que las mayores concentraciones de metales en los sedimentos de fondo se registraron en la llanura de inundación. Estos resultados probablemente se deben a la diferente granulometría del sedimento, que es limo-arcilloso en la llanura de inundación y arenoso en el cauce principal, lo cual disminuye la capacidad de adsorción del metal.
- Los mayores valores de densidad, riqueza y diversidad específica correspondieron en general a las estaciones de la llanura de inundación de ambas zonas, siendo la densidad el atributo que permitió la principal diferenciación entre SJ y E, con mayores valores en SJ. Sin embargo, la mayor densidad en SJ, no se debió a una mejor calidad del agua, sino a la dominancia de nemátodos. Por lo tanto, se concluye, que dichos atributos no son parámetros representativos en los tramos estudiados del sistema del río Salado, para determinar el grado de contaminación por metales.

- Se determinaron diferencias en la composición de los ensambles de macroinvertebrados bentónicos entre el cauce principal y la llanura de inundación de ambas zonas, presentando los citados ensambles mayor simplificación en E, y en el cauce de ambas, respecto a los de las llanuras.

Los taxa dominantes en la llanura de inundación de SJ, fueron: Mermithidae I, *C. gr. decorus*, Ceratopogonidae, *Coelotanypus* sp., *L. hoffmeisteri*, Planorbidae I, *D. (D.) multibranchiata*, *D. (A.) furcatus* y *D. (A.) vagus*. En el cauce principal, el ensamble estuvo formado por Ostracoda I, Mermithidae I, *D. (D.) nivea* y Sphaeriidae.

En la llanura de inundación de E, los taxa dominantes fueron: *B. americanum*, Mermithidae I, Ephydriidae I, Ostracoda I, *D. (D.) nivea*, Hirudinae I y *Campsurus* sp. En el cauce principal, Mermithidae I y *C. gr. decorus*.

- La dominancia de oligoquetos y quironómidos registradas en ambas zonas, no solo se debe a su tolerancia a los tóxicos, sino también a que son típicos de estos ambientes, debido a las características físicas (principalmente la granulometría y contenido de materia orgánica de los sedimentos de fondo). Los nemátodos por su parte, también son considerados como muy tolerantes a altas concentraciones de metales.
- En cuanto a los grupos funcionales tróficos (GFT), en SJ dominaron los depredadores, debido a las altas densidades de nemátodos. Mientras que en E, los colectores-recolectores de detritus fueron dominantes. Sin embargo, al igual que lo mencionado anteriormente, el análisis de GFT no resulta lo suficientemente claro en estos ambientes para determinar el grado de contaminación, porque como sucede en otros ambientes del sistema del río Paraná, aún en condiciones naturales, siempre son dominantes los colectores-recolectores de detritus.
- De los índices bióticos aplicados, sólo la relación densidad de oligoquetos *versus* densidad total, y densidad de quironómidos *versus* densidad total, permitió diferenciar a SJ de E. De acuerdo a dichos índices, E (cuya densidad está dada principalmente por los oligoquetos), tendría peor calidad del agua.
- Con el resto de los índices bióticos, se obtuvieron los mismos resultados para SJ y E. Ambas zonas tendrían el mismo grado de contaminación, lo cual es esperable

debido a las concentraciones registradas de metales en agua y a los taxa característicos del bentos mencionados. Además, encontramos con la aplicación del IBMWP e IMRP, que en las estaciones del cauce (en ambas zonas) se obtuvieron clasificaciones de peor calidad en relación a las estaciones de la llanura. Esto sucedió, debido a que en el cauce se obtuvieron bajos valores de riqueza específica y a los taxa registrados se les asigna también bajos valores por parte de estos índices.

- El molusco *P. canaliculata* y el oligoqueto *L. udekemianus* mostraron ser mejores bioacumuladores de metales, respectivamente, que *C. gr. decorus*. Por dichos resultados se las propone como especies indicadoras de contaminación de los citados metales en biomonitoreos de ambientes acuáticos.
- Los puntos finales más sensibles testeados para determinar efectos del Cu en *C. gr. decorus*, fueron la reducción del desarrollo larval y el éxito de la emergencia. Además, un biomarcador como las malformaciones bucales en *C. gr. decorus* puede ser un buen indicador para biomonitoreos de contaminación en campo, siendo de fácil detección. En *L. udekemianus*, el Cr afectó negativamente la reproducción.

En síntesis se puede concluir que el monitoreo conjunto de los metales, parámetros físicos y químicos y macroinvertebrados bentónicos, permitió comprobar el grado de perturbación antrópica por metales (Cr, Cu y Pb) que presenta la cuenca del río Salado del Norte, en los tramos estudiados.

Los principales aportes de este estudio fueron la evaluación comparativa de secciones laterales que incluyen el cauce principal y el área inundable del río Salado del Norte, para determinar desde un punto de vista sistémico la calidad del ambiente. Esto es fundamental a tener en cuenta porque generalmente las descargas de efluentes contaminantes se vierten en los cauces considerándolos como únicos depósitos mientras que en sistemas acuáticos con una dinámica de régimen hidrológico pulsátil (fases de aguas altas y fases de aguas bajas) el área inundable es la que cobra mayor importancia dado que es en esta zona donde se deposita en sedimentos la mayor concentración de tóxicos como fue demostrado en este trabajo. Por lo tanto, se recomienda en los

biomonitorios de ambientes acuáticos no sólo tener en cuenta el cauce sino su llanura para evaluar el grado de contaminación y recomendar estrategias de remediación o restauración.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y dada la importancia de contar con una especie nativa, abundante, de amplia distribución en el sistema del río Paraná y fácil captura como *Pomacea canaliculata*, se recomienda su uso en estudios de bioacumulación de metales. Otra especie que también se recomienda es *Limnodrilus udekemianus* típicamente bentónica que cumple con muchos de los atributos antes mencionados y es más recomendable que *Limnodrilus hoffmeisteri* (otro tubicino muy común) por ser de mayor tamaño y más fácil su manipulación ya que *L. udekemianus* a diferencia de *L. hoffmeisteri* no se enrolla sobre si mismo.

Las malformaciones bucales en quironómidos mostraron ser un biomarcador importante para tener en cuenta en monitoreos de la calidad ambiental, debido a la rápida respuesta a los efectos de metales en el ambiente, tal como se demostró en esta tesis.

Si bien es muy difícil encontrar un área prístina o con muy poco impacto, en futuros monitoreos que se realicen en la cuenca del río Salado se debería contar con otra zona de referencia menos afectada para poder determinar un gradiente más preciso de calidad del agua.

Finalmente, de acuerdo a los estudios expuestos en este trabajo se considera necesario el monitoreo permanente de los ambientes estudiados y la necesidad de implementar acciones de restauración y mayor control del vertido de los compuestos contaminantes que realizan las industrias y empresas ubicadas en la cuenca del citado río, que son las responsables de la situación señalada.



## V. Anexo

---

## CAPÍTULO 1

### Índices bióticos calculados:

- **IBMWP: Iberic Biological Monitoring Working Party** (Alba-Tercedor *et. al*, 2002). Las familias analizadas tienen un valor de tolerancia asignado, la suma total es el valor del índice.

$$\text{IBMWP} = \sum V_x$$

**Vx:** valor de tolerancia-sensibilidad de cada taxón.

- **IMRP: Índice de Macroinvertebrados para Ríos Pampeanos** (Rodrigues Capitulo, 1999). Es una adaptación del BMWP.

$$\text{IMRP} = \sum V_x$$

**Vx:** valor de tolerancia-sensibilidad de cada taxón.

- **ASPT: Average Score Per Taxón** (Friedich *et.al*, 1996).

$$\text{ASPT} = \text{IBMWP} / \text{RE}$$

RE: riqueza específica

**Relaciones de densidades:** en cada uno de los casos expresados como ind.m<sup>-2</sup>.

- Densidad de oligoquetos/densidad total (DT).
- Densidad de quironómidos/DT.

**Tabla 1.3:** Test de LSD-Fisher resultante del ANOVA de dos vías a las densidades del bentos, por estaciones y años.

		LSD test; variable log (datos densidades) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,05309, df = 24,000												
Cell No.	Esta	año	SJ1-05	SJ1-06	SJ2-05	SJ2-06	SJ3-05	SJ3-06	E1-05	E1-06	E2-05	E2-06	E3-05	E3-06
			1,5917	2,0688	2,9192	3,2017	3,8445	2,9886	1,5917	1,9098	2,3042	3,0782	3,3911	3,4048
1	SJ1	2005		0,018134	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000	0,103840	0,000900	0,000000	0,000000	0,000000
2	SJ1	2006	0,018134		0,000141	0,000000	0,000000	0,000055	0,018134	0,406262	0,222941	0,000017	0,000000	0,000000
3	SJ2	2005	0,000000	0,000141		0,146289	0,000051	0,715781	0,000000	0,000017	0,003247	0,406583	0,019310	0,016402
4	SJ2	2006	0,000000	0,000000	0,146289		0,002262	0,268410	0,000000	0,000000	0,000074	0,517649	0,324208	0,291169
5	SJ3	2005	0,000000	0,000000	0,000051	0,002262		0,000130	0,000000	0,000000	0,000000	0,000438	0,023966	0,028087
6	SJ3	2006	0,000000	0,000055	0,715781	0,268410	0,000130		0,000000	0,000007	0,001309	0,638143	0,042770	0,036709
7	E1	2005	1,000000	0,018134	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		0,103840	0,000900	0,000000	0,000000	0,000000
8	E1	2006	0,103840	0,406262	0,000017	0,000000	0,000000	0,000007	0,103840		0,046758	0,000002	0,000000	0,000000
9	E2	2005	0,000900	0,222941	0,003247	0,000074	0,000000	0,001309	0,000900	0,046758		0,000395	0,000006	0,000000
10	E2	2006	0,000000	0,000017	0,406583	0,517649	0,000438	0,638143	0,000000	0,000002	0,000395		0,109284	0,095389
11	E3	2005	0,000000	0,000000	0,019310	0,324208	0,023966	0,042770	0,000000	0,000000	0,000006	0,109284		0,942557
12	E3	2006	0,000000	0,000000	0,016402	0,291169	0,028087	0,036709	0,000000	0,000000	0,000006	0,095389	0,942557	

**Tabla 1.5:** Test de LSD-Fisher resultante del ANOVA de dos vías a las riquezas de especies del bentos, por estaciones y años.

		LSD test; variable RElog(x+1) (datos RE y H) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,03949, df = 24,000												
Cell No.	Est	año	SJ1-05	SJ1-06	SJ2-05	SJ2-06	SJ3-05	SJ3-06	E1-05	E1-06	E2-05	E2-06	E3-05	E3-06
			,10034	,20069	,59272	,75176	1,0335	,41842	,10034	,20069	,30103	,59272	,89555	,80275
1	SJ1	2005		0,542097	0,005714	0,000507	0,000006	0,061647	1,000000	0,542097	0,228083	0,005714	0,000053	0,000229
2	SJ1	2006	0,542097		0,023652	0,002378	0,000030	0,192151	0,542097	1,000000	0,542097	0,023652	0,000257	0,001091
3	SJ2	2005	0,005714	0,023652		0,336748	0,012043	0,293395	0,005714	0,023652	0,084803	1,000000	0,074242	0,207808
4	SJ2	2006	0,000507	0,002378	0,336748		0,095344	0,050973	0,000507	0,002378	0,010448	0,336748	0,384288	0,756032
5	SJ3	2005	0,000006	0,000030	0,012043	0,095344		0,000893	0,000006	0,000030	0,000143	0,012043	0,403720	0,167901
6	SJ3	2006	0,061647	0,192151	0,293395	0,050973	0,000893		0,061647	0,192151	0,476334	0,293395	0,007141	0,026240
7	E1	2005	1,000000	0,542097	0,005714	0,000507	0,000006	0,061647		0,542097	0,228083	0,005714	0,000053	0,000229
8	E1	2006	0,542097	1,000000	0,023652	0,002378	0,000030	0,192151	0,542097		0,542097	0,023652	0,000257	0,001091
9	E2	2005	0,228083	0,542097	0,084803	0,010448	0,000143	0,476334	0,228083	0,542097		0,084803	0,001225	0,004979
10	E2	2006	0,005714	0,023652	1,000000	0,336748	0,012043	0,293395	0,005714	0,023652	0,084803		0,074242	0,207808
11	E3	2005	0,000053	0,000257	0,074242	0,384288	0,403720	0,007141	0,000053	0,000257	0,001225	0,074242		0,572668
12	E3	2006	0,000229	0,001091	0,207808	0,756032	0,167901	0,026240	0,000229	0,001091	0,004979	0,207808	0,572668	

## VI. Referencias Bibliográficas

---

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alba-Tercedor, J. y Sanchez-Ortega, A. (1988). Un método rápido y simple para evaluar la calidad biológica de las aguas corrientes basado en el de Hellowell (1978). *Limnetica*. 4: 51-56.
- Alba-Tercedor, J.; Jáime-Cuellar, P.; Alvarez, M.; Aviles, J.; Bonada, N.; Casas, J.; Mellado, A.; Ortega, I.; Pardo, M.; Prat, N.; Rieradevall, M.; Robles, S.; Sáinz-Cantero, C.; Sanchez-Ortega, A.; Suarez, M.L.; Toro, M.; Vidal-Abarca, M.R.; Vivas, S. y Zamora Muñoz, C. (2004). Caracterización del estado ecológico de ríos mediterráneos ibéricos mediante el índice IBMWP (antes BMWP'). *Limnetica*. 21(3-4): 175-182.
- Allan, R.J. (1986). Sediment-related fluvial transmission of contaminants: some advances by 1979. *Inland Waters Directorate, Environment Canada, Scientific Series 107*, Ottawa, Canadá.
- Allen, H.; Gongmin, F. y Deng, B. (1993). Analysis of acid volatile sulfide (AVS) and simultaneously extracted metals (SEM) for estimation of potencial toxicity in aquatic sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 12:1441-1453.
- American Public Health Association (APHA) (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20<sup>th</sup> ed. Washington, DC.
- American Public Health Association (APHA). (2005). *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. 21<sup>th</sup> ed. Washington, DC.
- American Society for Testing and Materials (ASTM). (1999). Standard test methods for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. En: *Annual Book of ASTM Standards*. Vol.11-05. Philadelphia, PA. Pp.1146-1228.

- Andreotti, C. y Gagneten, A.M. (2006). Efectos ecotoxicológicos del sedimento del río Salado inferior (Argentina) en la sobrevivencia y reproducción de *Moina micrura* (Crustacea, Cladocera). *Rev. Toxicol.* 23: 146-150.
- Ankley, G.T.; Cook, P.M.; Carlson, A.R.; Call, D.J.; Swenson, J.A.; Corcoran, H.R. y Hoke, R.A. (1992). Bioaccumulation of PCBs from sediments by oligochaetes and fishes: comparison of laboratory and field studies. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 49:2080-2085.
- Armitage, P.D.; Moss, D.; Wright, J.F. y Furse, M.T. (1983). The performance of a new biological water quality score system based on macroinvertebrates over a wide range of unpolluted running-water sites. *Wat. Res.* 17: 333-347.
- Arocena, R. (1998). Statistical analysis of benthic communities to assess suspected degradation and recuperation zones in an urban stream (Uruguay). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 26(3):1188-1192.
- Barbour, M.T.; Gerritsen, J.; Snyder, B.D. y Stribling, J.B. (1999). *Rapid Bioassessment protocols for use in streams and wadable rivers: periphyton, benthic macroinvertebrates and fish*. Office of Water. US Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Batpista, D.F.; Buss, D.F.; Egler, M.; Giovanelli, A.; Silveira, M.P. y Nessimian, J.L. (2007). A multimetric index based on benthic macroinvertebrates for evaluation of Atlantic Forest streams at Rio de Janeiro State. Brazil. *Hydrobiología.* 575: 83-94.
- Bergman, H.L. y Dorward-King, E.J. (eds) (1997). *Reassessment of metals criteria for aquatic life protection: Priorities for research and implementation*. Society for Environmental Toxicology and Chemistry. Pensacola, FL.

- Berry, W.J.; Boothman, W.S.; Serbst, J.R. y Edwards, P.A. (2004). Predicting the toxicity of chromium in sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2981–2992.
- Bertoldi de Pomar, H.; Copes, C.; Ezcurra de Drago, I. y Marchese, M. (1986). Características limnológicas del río Paraná y sus principales tributarios en el tramo Goya-Diamante. Los sedimentos y su fauna. *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral.* 17 (1): 79-97.
- Bervoets, L.; Blust, R.; De Wit, M. y Verheyen, R. (1997). Relationships between river sediment characteristics and trace metal concentrations in tubificid worms and chironomid larvae. *Environ. Pollut.* 95:345-356.
- Brinkhurst, R.O. (1980). Pollution Biology. The North American Experience. En: *Aquatic Oligochaeta Biology*. (Brinkhurst, R. y Cook, D.). Plenum Press, N.Y. Pp.:471-476.
- Brinkhurst, R.O. y Marchese, M.R. (1991). *Guía para la identificación de oligoquetos acuáticos continentales de Sud y Centro América*. Colección Climax N° 6, 2<sup>da</sup> edición. *Asoc. Cs. Nat. Lit.* Pp.207.
- Brokovic-Popovic, I. y Popovic, M. (1977a). Effects of heavy metals on survival and respiration rate of tubificid worms: Part I-Effects on survival. *Environ. Pollut.* 13:65-72.
- Buffagni, A.; Erba, S.; Cazzola, M.; Murray-Bligh, J.; Soska, H. y Genoni, P. (2006). The STAR common metrics approach to the WFD intercalibration process: full application for small lowland rivers in three European countries. *Hydrobiología.* 566: 379-399.
- Burton, G.A. Jr. (1991). Assessing the toxicity of freshwater sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 10: 1585-1627.

- Callisto, M.; Marques, M.M. y Barbosa, F.A. (2000). Deformities in larval *Chironomus* (Diptera, Chironomidae) from the Piracicaba River, southeast Brazil. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 27:2699-2702.
- Canadian Environmental Quality Guidelines (CEQA) (2003). Canadian Council of Ministers of the Environment. Ottawa, Ontario, Canada.
- Cao, Y.; Larsen, D.P.; Hughes, R.M.; Angermeier, P.L. y Patton, T.M. (2002). Sampling effort affects multivariate comparisons of stream assemblages. *J.N. Am. Benthol. Soc.* 21: 701-714.
- Cardinale, B.J.; Srivastava, D.S.; Duffy, J.E.; Wright, J.P.; Downing, A.L.; Sankaran, M.; Jouseau, C.; Cadotte, M.W.; Carroll, I.T.; Weis, J.J.; Hector, A. y Loreau, M. (2009). Effects of biodiversity on the functioning of ecosystems: a summary of 164 experimental manipulations of species richness. *Ecology.* 90(3): 854.
- Carriquiriborde, P. y Ronco, A.E. (2008). Distinctive accumulation patterns of Cd (II), Cu (II), and Cr (VI) in tissue of the South American teleost, pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Aquat. Toxicol.* 86: 313-322.
- Castañé, P.M.; Topalián, M.L.; Cordero, R.R. y Salibián, A. (2003). Influencia de la especiación de los metales pesados en medio acuático como determinante de su toxicidad. *Rev. Toxicol.* 20: 13-18.
- Ceresoli, N. y Gagneten, A.M. (2003). Efectos del efluente de curtiembre sobre *Ceriodaphnia dubia* (Crustacea, Cladocera) en condiciones experimentales. *Interciencia.* 28 (8): 469-475.
- Chapman, P.M.; Churchland, L.M.; Thomson, P.A. y Michnowsky, E. (1980). Heavy metal studies with oligochaetes. En: *Aquatic Oligochaeta Biology.* (Brinkhurst, R.O. y Cook, D.G.). Plenum Press, N.Y. Pp.477-502.



- Chapman, P.M.; Power, E.A. y Burton, G.A. Jr (1992). Integrative assessments in aquatic ecosystems. En: *Contaminated sediment toxicity assessment*. (Burton, G.A Jr). Lewis Publishers. Chelsea, Michigan. Pp. 313-340.
- Chapman, P.M; Allen, H.E; Godtfredsen, K. y Z'Graggen, M.N. (1996). Evaluation of bioaccumulation factors in regulating metals. *Environ. Sci. Technol.* 30: 448-452.
- Chapman, P.M. (2001). Utility and relevance of aquatic oligochaetes in Ecological Risk Assessment. *Hydrobiologia.* 463: 149–169.
- Chibunda, R.T. (2009). Chronic toxicity of mercury (HgCl<sub>2</sub>) to the benthic midge *Chironomus riparius*. *Int. J. Environ. Res.* 3(3): 455-462.
- Chukwu, L.O y Odunzeh, C.C. (2006). Relative toxicity of spent lubricant oil and detergent against benthic macro-invertebrates of a west african estuarine lagoon. *J. Environ. Biol.* 27: 479-484.
- Correa-Araneda, F.; Rivera, R.; Urritia, J.; De los Ríos, P.; Contreras, A. y Encina-Montoya, F. (2010). Efectos de una zona urbana sobre la comunidad de macroinvertebrados bentónicos de un ecosistema fluvial del sur de Chile. *Limnetica.* 29 (2): 183-194.
- Cortelezzi, A.; Paggi, A.C.; Rodríguez, M.A. y Rodrigues Capítulo, A. (2011). Taxonomic and nontaxonomic responses to ecological changes in an urban lowland stream through the use of Chironomidae (Diptera) larvae. *Sci. Tot. Environ.* 409: 1344–1350.
- Croce, V.; De Angelis, S.; Patrolecco, L.; Polesello, S. y Valsecchi, S. (2005). Uptake and accumulation of sediment-associated 4-Nonylphenol in a benthic invertebrate

- (*Lumbriculus variegatus*, freshwater oligochaete). *Environ. Toxicol. Chem.* 24: 1165-1171.
- Cuezzo, M.G. (2009). Mollusca Gastropoda. Cap. 19. *Macroinvertebrados bentónicos sudamericanos. Sistemática y biología*. Fundación Miguel Lillo. Tucumán, Argentina. Pp. 595-599.
- Cummins, K.W. (1973). Trophic relations of aquatic insects. *Ann. Rev. Entomol.* 18: 183-206.
- Cushman, R.M. (1984). Chironomid deformities as indicator of pollution from a synthetic, coal-derived oil. *Fresh. Biol.* 14: 179-182.
- Deeds, J.R. y Klerks, P.L. (1999). Metallothionein-like proteins in the freshwater oligochaete *Limnodrilus udekemianus* and their role as a homeostatic mechanism against cadmium toxicity. *Environ. Pollut.* 106: 381-389.
- De Forest, D.K.; Brix, K.V. y Adams, W.J. (2007). Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: The inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. *Aquat. Toxicol.* 84: 236-246.
- De Hass, E.M.; Paumen, M.L.; Koelmans, A.A. y Kraak, M.H. (2004). Combined effects of copper and food on the midges *Chironomus riparius* in whole-sediment bioassays. *Environ. Pollut.* 127:99-107.
- De Pauw, N. y Hawkes, H.A. (1993). Biological monitoring of river water quality. En: *River Water Quality Monitoring and Control*. (Walley, W.J. y Judd, S.). Aston University, UK.
- Deplege, M.H.; Weeks, J.M. y Bjerregaard, P. (1998). Heavy Metals. *Handbook of Ecotoxicology*. (Callow, P.). Blackwell Science. UK. Pp. 871.

- Dias, V.; Vasseur, C. y Bonzom, J.M. (2008). Exposure of *Chironomus riparius* larvae to uranium: effects on survival, development time, growth, and mouthpart deformities. *Chemosphere*. 71 (3):574–581.
- Dickman, M.; Brindle, I. y Benson, M. (1992). Evidence of teratogens in sediments of the Niagara river watershed as reflected by chironomid (Diptera: Chironomidae) deformities. *J. G. Lakes Res.* 18: 467-480.
- Dirksen, S.; Boudewijn, T.J.; Slager L.K. y Mes, M.G. (1991). Breeding success of Cormorants in relation to the contamination of their feeding grounds. En: *Proceedings workshop 1989 on Cormorants Phalacrocorax carbo*. (Van Eerden, M.R. y Zijlstra, M.). Pp. 232-243.
- Dolédéc, S. y Statzner, B. (2010). Responses of freshwater biota to human disturbances: contribution of *J-NABS* to developments in ecological integrity assessments. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 29 (1): 286-311.
- Dominguez, E. y Fernandez, H.R. (Eds.) (2009). *Macroinvertebrados bentónicos sudamericanos. Sistemática y biología*. Fundación Miguel Lillo. Tucumán, Argentina. Pp.654.
- Dornfeld, C.B.; Moreira-Santos, M.; Espíndola, E.L. y Ribeiro, R. (2009). Do larvae and ovipositing *Chironomus riparius* (Díptera: Chironomidae) females avoid copper-contaminated environments? *Hum. Ecol. Risk. Ass.: An Internat. J.* 15:63-75.
- Duran, M. y Suicmez, M. (2007). Utilization of both benthic macroinvertebrates and physicochemical parameters for evaluating water quality of the stream Cekerek (Tokat, Turkey). *J. Environ. Biol.* 28: 231-236.

- Edward, F.B.; Yap, C.K.; Ismail, A. y Tan, S.G. (2009). Interspecific variation of heavy metal concentrations in the different parts of tropical intertidal bivalves. *Water Air Soil Pollut.* 196: 297-309.
- Egeler, P.; Römbke, J.; Meller, M.; Knacker, T.; Franke, C.; Studinger, G. y Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of Lindane and Hexachlorobenzene by Tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardized laboratory conditions. *Chemosphere.* 35 (4): 835-852.
- Egeler, P.; Meller, M.; Roembke, J.; Spoerlein, P.; Streit, B. y Nagel, R. (2004). *Tubifex tubifex* as a link in food chain transfer of hexachlorobenzene from contaminated sediment to fish. *Hydrobiologia.* 463: 171-184.
- Espíndola, E.L.; Paschoal, C.M.; Rocha, O.; Bohrer, M.B. y Oliveira Neto A. (2000). *Ecotoxicología-Perspectiva para o Século XXI*. Rima. San Carlos. Pp.575.
- Ezcurra de Drago, I.; Marchese, M. y Montalto, L. (2007). Benthic Invertebrates. En: *The Middle Paraná River: Limnology of a Subtropical Wetland*. (Iriondo, M.H.; Paggi, J.C. y Parma, M.J.). Springer-Verlag. Berlin. Pp: 251-275.
- Farag, A.M.; Woodward, D.F.; Goldstein, J.N.; Brumbaugh, W. y Meyer, J.S. (1999). Concentrations of metals associated with mining waste in sediments, biofilm, benthic macroinvertebrates, and fish from the Coeur d'Alene River basin, Idaho. *Arch. Environ. Cont. Toxicol.* 34:119-127.
- Fernández, H.R.; Romero, F.; Vece, M. B.; Manzo, V.; Nieto, C. y Orce, M. (2002). Evaluación de tres índices bióticos en un Río Subtropical de Montaña (Tucumán, Argentina). *Limnética.* 21 (1-2): 1-13.

- Fernández, H.R.; Domínguez, E.; Romero, F. y Cuezso, M.G. (2006). La calidad del agua y la bioindicación en los ríos de montaña del Noroeste Argentino. Fundación Miguel Lillo, 1<sup>ra</sup>ed. Pp.42.
- Ferrari, L.; Eissa, B.L.; Salibián, A. y Borgnia, M. (2006). *Bioindicadores de contaminación acuática: parámetros morfológicos y fisiológicos de peces. Salud ambiental y humana. Una visión holística.* (Herkovits, J.). SETAC Latinoamérica. Pp. 106-108.
- Ferreira, A.G.; Machado, A.L. y Zalmon, I.R. (2000). Metais pesados em moluscos bivalves no litoral norte do Estado do Rio de Janeiro. En: *Ecotoxicologia- Perspectivas para o Século XXI.* (Gaeta Espíndola, E.L.; Rispoli Botta Paschoal, C.M.; Rocha, O.; Camino Bohrer, M.B. y Lopes de Oliveira Neto, A.). Rima. San Carlos, Brasil. Pp.167-181.
- Figueroa, R.; Valdovinos, C.; Araya, E. y Parra, O. (2003). Macroinvertebrados bentónicos como indicadores de calidad de agua del sur de Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 76: 275-285.
- Filion, A. y Morin, A. (2000). Effect of local sources on metal concentrations in littoral sediments and aquatic macroinvertebrates of the St. Lawrence River, near Cornwall, Ontario. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57 (1): 113-125.
- Förstner, U y Wittmann, G.T. (1983). *Metal pollution in the aquatic environment.* Springer-Verlag, Heidelberg. Pp. 486.
- Franke, C.; Studinger, G.; Berger, G.; Böhling, S.; Bruckmann, U.; Cohors-Fresenborg, D. y Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere.* 29(7): 1501-1514.

- Franklin, N.M.; Stauber, J.L.; Lim, R.P y Petocz, P. (2002). Toxicity of metal mixtures to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.): the effect of interactions between copper, cadmium, and zinc on metal cell binding and uptake. *Environ. Toxicol. Chem.* 21: 2412-2422.
- Friedrich, G.; Chapman, D. y Beim, A. (1996). *The Use of Biological Material in Water Quality Assessments: A Guide to the Use of Biota, Sediments and Water in Environmental Monitoring*. 2<sup>nd</sup> ed. (Deborah Chapman). E & FN Spon, New York.
- Gagneten, A.M. (2002). Respuesta de una comunidad zooplanctónica de agua dulce a la aplicación de cromo en clausuras experimentales. *Interciencia*. 27 (10): 563-570.
- Gagneten, A.M. y Marchese, M.R. (2003). Effects of Paraquat on zooplankton and zoobenthic assemblages in enclosures experiments. *Ecohy. Hydrobiol.* 3(4):255-264.
- Gagneten, A.M y Ceresoli, N. (2004). Efectos de efluentes de curtiembre sobre la abundancia y riqueza de especies del zooplankton en el arroyo Las Prusianas (Santa Fe, Argentina). *Interciencia*. 29 (12): 702-708.
- Gagneten, A.M.; Gervasio S. y Paggi, J.C. (2007). Heavy metal pollution and eutrophication in the lower Salado River basin (Argentina). *Water Air Soil Pollut.* 178: 335–349.
- Gagneten, A.M. (2008). *Respuestas del zooplankton a la contaminación por cromo en la cuenca del río Salado inferior (Santa Fe, Argentina)*. Tesis. Universidad Nacional del Litoral. Pp.140.
- Gagneten, A.M.; Imhof, A. y Gervasio, S. (2008). Accumulation and elimination of Cr in gills and eggs of *Zilchiopsis collastinensis* (Crustacea, Decapoda) after experimental exposure. *Fresen. Environ. Bull.* 17 (2): 182-187.

- Gagneten, A.M. e Imhof, A. (2009). Chromium (Cr) accumulation in the freshwater crab, *Zilchiopsis collastinensis*. *J. Environ. Biol.* 30 (3) 345-348.
- Gagneten, A.M. y Paggi, J.C. (2009). Effects of heavy metal contamination (Cr, Cu, Pb, Cd) and eutrophication on zooplankton in the lower basin of the Salado River (Argentina). *Water Air Soil Pollut.* 198: 317–334.
- Gallo, M. y Trento, A. (1999). Evidencias de As, Cr, Hg y Pb en aguas superficiales de la cuenca inferior del Río Salado. Actas de Ambiental'99. U.N. de San Juan. Pp.221-227.
- Gallo, M.; Trento, A.; Avarez, A.; Beloméxico, H. y Campagnoli, D. (2006). Dissolved and particulate heavy metals in the Salado River (Santa Fe, Argentina). *Water Air Soil Pollut.* 174: 367- 384.
- Gibson, G.R.; Barbour, M.T.; Stribling, J.B.; Gerritsen, J. y Karr, J.R. (1996). *Biological Criteria: Technical Guidance for Streams and Small Rivers*. Revised Edition. Office of Water. US Environmental Protection Agency. Washington, DC.
- Gillis, P.L.; Reynoldson, T.B. y Dixon, D.G. (2004). Natural variation in a metallothionein-like protein in *Tubifex tubifex* in the absence of metal exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58:22-28.
- Girling A.E.; Pascoe, D.; Janssen, C.R.; Peither, A.; Wenzel, A.; Schäfer, H.; Neumeier, B.; Mitchell, G.C.; Taylor, E.J.; Maund, S.J.; Lay, J.P.; Jüttner, I.; Crossland, N.O.; Stephenson, R.R. y Persoone, G. (2000). Development of methods for evaluating toxicity to freshwater ecosystems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45:148-176.
- Gray, J.S. (1989). Effects of environmental stress on species rich assemblages. *Biol. J. Linnean Soc.* 37: 19-32.

- Greenwood, N.N. y Earnshaw, A. (2001). *Chemistry of the Elements*. Pergamon Press, Oxford.
- Gualdoni, C.M. y Corigliano, M. (1991). El ajuste de un índice biótico para uso regional. *Rev. UNRC*. 11(1):43-49.
- Gutierrez, M.F.; Gagneten, A.M. y Parma, J. (2007) Bioconcentration and trophic transfer of chromium in the system *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera)-*Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). *Fres. Environ. Bull.* 17: 647-651.
- Hadad, H.; Maine, M.A. y Bonetto, C. (2007). Nutrient effect on metal tolerance in *Salvinia herzogii*. *Ecol. Engin.* 31: 122-131.
- Hadad, H.R.; Mufarrege, M.M.; Pincioli, G.M.; Di Luca, G.A. y Maine, M.A. (2010). Morphological response of *Typha domingensis* to an industrial effluent containing heavy metals in a constructed wetland. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58 (3): 666-675.
- Hadad, H.R.; Maine, M.A.; Mufarrege, M.M.; Del Sastre, M.V. y Di Luca, G.A. (2011). Bioaccumulation kinetics and toxic effects of Cr, Ni and Zn on *Eichhornia crassipes*. *J. Hazar. Mat.* 190: 1016-1022.
- Hatakeyama, S. y Yasuno, M. (1981). A method for assessing chronic effects of toxic substances on the midge, *Paratanytarsus parthenogeneticus*-effects of copper. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 10:705-713.
- Hellawell, J.M. (1978). *Biological surveillance of rivers*. Water research Center. Stevenage, UK.
- Hellawell, JM. (1986). *Biological indicators of Freshwater Pollution and Environmental*



- Management*. Elsevier applied Science. Pp.546.
- Higuti, J. y Takeda, A.M. (2002). Spatial and temporal variation in densities of chironomid larvae (Diptera) in two lagoons and two tributaries of the Upper Paraná River Floodplain, Brazil. *Braz. J. Biol.* 62 (4B): 807-818.
- Hilsenhoff, W.L. (1988). Rapid field Assessment of organic pollution with a family-level biotic index. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 7 (1): 65-68.
- Honeycutt, M.E.; Roberts, B.L. y Roane, D.S. (1995). Cadmium disposition in the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 30:143-150.
- Hooper, D.U. y Vitousek, P.M. (1997). The effects of plant composition and diversity on ecosystem processes. *Science.* 277: 1302-1305.
- Howard, B.; Mitchell, P.; Ritchie, A.; Simkiss, K. y Taylor, M. (1981). The composition of intracellular granules from the metal-accumulating cells of the common garden snail (*Helix aspersa*). *Biochem. J.* 194: 507-511.
- Hynes, H.B.N. (1960). *The Biology of polluted waters*. Liverpool University Press.
- Hynes, H.B.N. (1978). *The Biology of Polluted Waters*. Univ. Toronto Press.
- Hyötyläinen, T. y Oikari, A. (2004). Bioaccumulation of PAHs from creosote-contaminated sediment in a laboratory-exposed freshwater oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. *Chemosphere.* 57:159–164.
- Iannacone, J. y Alvarino, L. (2004). Variabilidad de un ensayo ecotoxicológico con *Chironomus calligraphus* Goeldi (Diptera: Chironomidae) para evaluar cobre. *Rev. Per. Ent.* 44: 125-130.

- Iannacone, J. y Salazar, N. (2007). Efecto de mezclas binarias de tres metales pesados sobre larvas de *Chironomus calligraphus*. *J. Brasz. Soc. Ecotoxicol.* 2(3): 211-217.
- INCyTH (1986). Características hidrológicas de la cuenca del río Salado. M.O.S.P. Secretaría de Recursos Hídricos. Centro Regional Litoral-INCyTH. Santa Fe. Vol.1. Pp.197.
- InfoStat (2004). *InfoStat, versión 2004*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. 1<sup>ra</sup>ed. Editorial Brujas Argentina.
- Ingersoll, C.G.; Brunson, E.L.; Wang, N.; Dwyer, F.J.; Ankley, G.T.; Mount, D.R.; Herckins, J.; Petty, J. y Landrum, P.F. (2003). Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 872-885.
- Janssens de Bisthoven, L.; Timmermans, K. y Ollevier, F. (1992). The concentration of cadmium, lead, copper and zinc in *Chironomus* gr. *thummi* larvae (Diptera, Chironomidae) with deformed versus normal menta. *Hydrobiologia.* 239:141-149.
- Janssens de Bisthoven, L.; Vermeulen, A. y Ollevier, F. (1998). Experimental induction of morphological deformities in *Chironomus riparius* by chronic exposure to copper and lead. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35:249-256.
- Janssens de Bisthoven, L.; Postma, J.; Vermeulen, A.; Goemans, G. y Ollevier, F. (2001). Morphological deformities in *Chironomus riparius* Meigen larvae after exposure to cadmium over several generations. *Water Air Soil Poll.* 129(1): 167-179.
- Jones, C.G. y Lawton, J.H. (1995). *Linking species and Ecosystems*. Chapman & Hall. New York. Pp.387.

- Karayakar, F.; Erdem, C. y Cicik, B. (2007). Seasonal variation in Copper, Zinc, Chromium, Lead and Cadmium levels in hepatopancreas, gill and muscle tissues of the mussel *Brachidontes pharaonis* Fischer, collected along the Mersin Coast, Turkey. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 79:350–355.
- Kennedy, C.R. (1966). The life history of *Limnodrilus hoffmeisteri* Clap. (Oligochaeta: Tubificidae) and its adaptive significance. *Oikos*. 17:158-168.
- Kerans, B.L. y Karr J.R. (1994). A benthic index of biotic integrity (B-IBI) for rivers of the Tennessee Valley. *Ecol. Applicat.* 4: 76-785.
- Khengarot, B.S. (1991). Toxicity of metals to a freshwater tubificid worm, *Tubifex tubifex* (Muller). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46: 906-912.
- Khengarot, B.S; Rathore, R.S. y Singh, B.B. (2003). pH-dependent toxicity of heavy metals to a freshwater sludge worm *Tubifex tubifex* Müller. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71: 283-289.
- Klerks, P.L. y Levinton, J.S. (1989). Rapid evolution of metal resistance in a benthic oligochaete inhabiting a metal-polluted site. *Biol. Bull.* 176:135-141.
- Klerks, P.L. y Bartholomew, P.R. (1991). Cadmium accumulation and detoxification in a Cd-resistant population of the oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri*. *Aquat. Toxicol.* 19:97-112.
- Kolkwitz, R. y Marsson, M. (1902). Grundsätze für die biologische Beurteilung des Wassers nach seiner Flora und Fauna. *Mitteilungen aus der Königlichen Prüfungsanstalt für Wasserversorgung und Abwasserbeseitigung*. 1: 3–72.

- Kosalwat, P. y Knight, A.W. (1987a). Acute toxicity of aqueous and substrate-bound copper to the midge, *Chironomus decorus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 16:275-282.
- Kosalwat, P. y Knight, A.W. (1987b). Chronic Toxicity of copper to a partial life cycle of the midge, *Chironomus decorus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 16:283-290.
- Kovach, W.L. (2001). *Multivariate Statistical Package Computing Services*. United Kingdom.
- Krantzberg, G. (1989). Accumulation of essential and nonessential metals by chironomids larvae in relation to physical and chemical properties of the elements. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46: 1755-1761.
- Krantzberg, G. y Stokes, P.M. (1989). Metal regulation, tolerance and body burdens in the larvae of the genus *Chironomus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46: 389-398.
- Kuhlmann, M.L.; Hayashida, C.Y. y Araújo, R.P. (2000). Using *Chironomus* (Chironomidae: Diptera) mentum deformities in environmental assessment. *Acta Limnol. Bras.* 12: 55-61.
- Lafont, M. (1984). Oligochaetes communities as biological descriptors of pollution in the fine sediments of rivers. *Hydrobiologia.* 155: 127-130.
- Lang, C.; l'Eplattenier, G. y Reymond, O. (1989). Water quality in rivers of western Switzerland: Application of an adaptable index based on benthic invertebrates. *Aquat. Sci.* 51(3): 224-234.
- Langer-Jasrich, M.; Köhler, H.R y Gerhardt, A. (2010). Can mouth part deformities of *Chironomus riparius* serve as indicators for water and sediment pollution? A laboratory approach. *J. Soils Sedim.* 10: 414-422.

- Leduc, F.; Whale, J.K. y Sunahara, G.I. (2008). Growth and reproduction of the earthworm *Eisenia fetida* after exposure to leachate from wood preservatives. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69:219-226.
- Leppänen, M.T. y Kukkonen, J.V. (2000). Fate of sediment-associated pyrene and benzo(a)pyrene in the freshwater oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Aquat. Toxicol.* 49:199-212.
- Liber, K.; Call, D.J.; Dawson, T.D.; Whiteman, F.W. y Dillon, T.M. (1996). Effects of *Chironomus tentans* larval growth retardation on adult emergence and ovipositing success: implications for interpreting freshwater sediment bioassays. *Hydrobiologia.* 323: 155-167.
- Lopretto, C.E. y Tell, G. (1995). *Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio*. Ed. Sur. Tomo I, II y III. La Plata, Argentina.
- Lucan-Bouché, M.L.; Biagianti-Risbourg, S.; Arsac, F. y Vernet, G. (1999). An original decontamination process developed by the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* exposed to copper and lead. *Aquat. Toxicol.* 45:9-17.
- Luoma, S.N. y Rainbow, P.S. (2005). Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. *Environ. Sci. Technol.* 39: 1921-1931.
- Maanan, M. (2008). Heavy metal concentrations in marine molluscs from the Moroccan coastal region. *Environ. Pollut.* 153: 176-183.
- Maine, M.A; Duarte, M.V. y Suñé, N.L. (2001). Cadmium Uptake by *Pistia Stratiotes*. *Wat. Res.* 35: 2629-2634.

- Maine, M.A; Suñe, N.L. y Lager, S.C. (2004). Chromium bioaccumulation: comparison of the capacity of two floating aquatic macrophytes . *Wat. Res.* 38: 1494-1501.
- Maine, M.A; Suñe, N.; Hadad, H.; Sánchez, G.; Caffaratti, S. y Bonetto, C. (2005). Depuración del efluente de una industria metalúrgica utilizando un wetland construido. *Ing. Sanit. Amb.* 79: 45-49.
- Maine, M.A; Suñe, N.; Hadad, H.; Sánchez, G. y Bonetto, C. (2006). Nutrient and metal removal in a constructed wetland for waste-water treatment from a metallurgic industry. *Ecolog. Engin.* 26:341-347.
- Maine, M.A; Suñe, N.; Hadad, H.; Sánchez, G. y Bonetto, C. (2007). Removal efficiency of a constructed wetland for wastewater treatment according to vegetation dominance. *Chemosphere.* 68:1105–1113.
- Manzi, R. y Gallardo, M. (1970). Geografía de Santa Fe. (Spadoni S.A.). Mendoza, Argentina. Pp.192 pp.
- Marchese, M. (1997). *Uso del zoobentos en la evaluación de calidad de aguas en ambientes lóticos del río Paraná Medio*. Tesis. Universidad Nacional del Litoral. Pp.198.
- Marchese, M.R. y Brinkhurst, R.O. (1996). A comparison of two tubificid oligochaete species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. *Hydrobiologia.* 334: 163-168.
- Marchese, M. y Ezcurra de Drago, I. (1983). Zoobentos de los principales tributarios del Río Paraná medio en el tramo Goya-Diamante. Su relación con el cauce principal y cauces secundarios. *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral.* 14: 97-107.
- Marchese, M. y Ezcurra de Drago, I. (1992). Benthos of the lotic environments in the

- middle Paraná River system: transverse zonation. *Hydrobiologia*. 237: 1-13.
- Marchese, M. y Ezcurra de Drago, I. (1999). Use of benthic macroinvertebrates as organic pollution indicators in lotic environments of the Paraná River drainage basin. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 46 (3-4): 233-255.
- Marchese, M., Gagneten, A.M.; Parma, M.J. y Pavé, P.J. (2008b). Accumulation and elimination of chromium by freshwater species exposed to spiked-sediments. *Arch. Environ. Cont. Toxicol.* 55:603-609.
- Marchese, M.; Rodríguez, A.R.; Pavé, P. y Carignano, M.C. (2008a). Benthic invertebrate structure in wetlands of a tributary of the Middle Paraná River affected by hydrologic and anthropogenic disturbances. *J. Env. Biol.* 29 (3): 343-348.
- Marcovecchio, J.E.; Botté, S.E. y Freije, R.H. (2007). Heavy Metals, Major Metals, Trace Elements. En: *Handbook of Water Analysis*. (Nollet, L.). Taylor and Francis Group LCC, Florida, USA. Pp.784.
- Marques, M.M. y Barbosa, F. (2001). Biological quality of waters from an impacted tropical watershed (middle Río Doce basin, southeast Brazil), using benthic macroinvertebrate communities as an indicator. *Hydrobiologia*. 457:69-76.
- Martinez, E.A.; Moore, B.C.; Schaumlöffel, J. y Dasgupta, N. (2003). Morphological abnormalities in *Chironomus tentans* exposed to cadmium and copper-spiked sediments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55: 204-212.
- Martinez, E.A.; Wold, L.; Moore, B.C. y Dasgupta, N. (2006). Morphologic and growth response in *Chironomus tentans* to arsenic exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51: 529-536.
- Merrit, R.W. y Cummins, K.W. (1996). *An introduction to the Aquatic insects of North America*. Kendall/Hunt Pub. Co. Iowa, USA. Pp.414.

- Milbrink, G. (1994). Oligochaetes and water pollution in two deep Norwegian lakes. *Hydrobiologia*. 278: 213-222.
- Millward, R.N y Grant, A. (1995). Assessing the impact of copper on nematode communities from a chronically metal-enriched estuary using pollution-induced community tolerance. *Mar. Pollut. Bull.* 30(11): 701-706.
- Millward, R.N. y Grant, A. (2000). Pollution-induced tolerance to copper of nematode communities in the severely contaminated restronguet creek and adjacent estuaries, Cornwall, United Kingdom. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 454–461.
- Miño, L.A.; Folco, S.; Pechén de D´Angelo, A.M. y Verrengia Guerrero, N.R. (2006). Modeling lead bioavailability and bioaccumulation by *Lumbriculus variegatus* using artificial particles. Potential use in chemical remediation processes. *Chemosphere*. 63:261-268.
- Miserendino, M.L. (1995). Composición y distribución del macrozoobentos de un sistema lótico andino-patagónico. *Ecología Austral*. 5(2):133-142.
- Miserendino, M.L. (2007). Macroinvertebrate functional organization and water quality in a large arid river from Patagonia (Argentina) *Ann. Limnol. - Int. J. Lim.* 43 (3): 133-145.
- Moore, J.M. (1991). Inorganic contaminants of surface wáter. En: *Research and monitoring priorities*. Springer-Verlag. Pp.83-176.
- Motta, R.L. y Uieda, V.S. (2004). Diet and trophic groups of an aquatic insect community in a tropical stream. *Braz. J. Biol.* 64 (4): 809-817.



- Moya, N.; Tomanova, S. y Oberdoff, T. (2007). Initial development of a multi-metric index based on aquatic macroinvertebrates to assess streams condition in the Upper Isiboro-Sécure Basin, Bolivian Amazon. *Hydrobiologia*. 589: 107-116.
- Mufarrege, M.; Hadad, H. y Maine, M.A. (2010). Response of *Pistia stratiotes* to heavy metals (Cr, Ni, and Zn) and phosphorous. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58(1): 53-61.
- Naeem, S.; Bunker, D.E.; Hector, A.; Loreau, M. y Perrings, C. (2009). Can we predict the effects of global change on biodiversity loss and ecosystem functioning? En: *Biodiversity, Ecosystem Functioning, and Human Wellbeing An Ecological and Economic Perspective*. (Naeem, S.; Bunker, D.E.; Hector, A.; Loreau, M. y Perring, C). Oxford press. Pp. 290-298.
- Nazarova, L.; Riss, H.; Kahlheber, A. y Werding, B. (2004). Some observations of buccal deformities in chironomid larvae (Diptera: Chironomidae) from the Ciénaga Grande de Santa Marta, Colombia. *Caldasia*. 26(1):275–290.
- Nebeker, A.V.; Cairns, M.A. y Wise, C.M. (1984). Relative sensitivity of *Chironomus tentans* life stages to copper. *Environ. Toxicol. Chem.* 3: 151-158.
- Newman, M.C. (1998). *Fundamentals of ecotoxicology*. Sleeping Bear/Ann Arbor press. Chelsea, Mich.
- Newman, M.C. y Unger, M.A. (2003). *Fundamentals of ecotoxicology*. Lewis Publishers, Boca Raton. Fl.
- Niemi, G.J. y Mc Donald, M.E. (2004). Application of ecological indicators. *Ann. Rev. Ecol. Evolut. System.* 35: 89-111.

- Ocón, C.S; Rodriguez Capítulo, A. y Paggi, A.C. (2008). Evaluation of zoobenthic assemblages and recovery following petroleum spill in a coastal area of Río de la Plata estuarine system, South America. *Environ. Pollut.* 156: 82-89.
- Organization for Economic Cooperation, Development (OECD) (2004). Guideline for the Testing of Chemicals No. 218: "*Sediment-water chironomid toxicity test using spiked sediment*". OECD, Paris.
- Paggi, A.C. (1999). Los Chironomidae como indicadores de calidad de ambientes dulceacuícolas. Actas del IV Congreso argentino de Entomología. Mar del Plata *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 58 (1-2): 202- 207.
- Paggi, A.C.; Tangorra, M.; Ocón, C. y Rodrigues Capítulo, A. (2006). Response of the zoobenthos community along the dispersion plume of highly polluted stream in the receiving waters of a large river (Rio de la Plata, Argentina). *Hydrobiologia.* 568: 1-14.
- Parma, M.J.; Campana, M. y Loteste, A. (2008). Uptake and elimination of chromium in *Cnesterodon decemmaculatus*; Pisces: Poeciliidae, after a sub-chronic experimental exposure. *Fres. Environ. Bull.* 17 (3): 293-297.
- Pascoe, D.; Kendall, A.W. y Green, D.W. (1989). Chronic toxicity of cadmium to *Chironomus riparius* Meigen. Effects upon larval development and adult emergence. *Hydrobiologia.* 175: 109-115.
- Patrick, E.M. y Loutit, M. (1978). Passage of metals to freshwater fish from their food. *Water Res.* 12:395-398.
- Pavé, P. y M. Marchese (2005). Invertebrados bentónicos como indicadores de calidad del agua en ríos urbanos (Paraná-Entre Ríos, Argentina). *Ecol. Austral.* 15: 183-197.

- Penttinen, O.P.; Kilpi-Koski, J.; Jokela, M.; Toivainen, K. y Väisänen, A. (2008). Importance of dose metrics for lethal and sublethal sediment metal toxicity in the oligochaete worm *Lumbriculus variegatus*. *J. Soils Sediments*. 8:59-66.
- Péry, A.R.; Ducrot, V.; Mons, R. y Garric, J. (2003). Modelling toxicity and mode of action of chemicals to analyze growth and emergence tests with the midge *Chironomus riparius*. *Aquatic Toxicol.* 65: 281-292.
- Péry, A.R.; Béthune, A.; Gahou, J.; Mons, R. y Garric, J. (2005). Body residues: a key variable to analyze toxicity test with *Chironomus riparius* exposed to copper-spiked sediments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61:160-167.
- Phipps, L.; Ankley, G.T.; Benoit, D.A. y Mattson, V.R. (1993). Use of aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediments associated contaminants. *Environ. Toxicol. Chem.* 12: 269-279.
- Plafkin, J.L.; Barbour, M.T.; Porter, K.D.; Gross, S.K. y Hughes R.M. (1989). *Rapid bioassessment protocols for use in streams and rivers: benthic macroinvertebrates and fish*. Office of Water Regulations and Standards, US Environmental Protection Agency. Washington, DC.
- Poddubnaya, T.L. (1980). Life cycles of mass species of tubificidae (Oligochaeta). En: *Aquatic oligochaete biology*. (Brinkhurst, R.O. y Cook, D.G.). Plenum. NY, USA. Pp. 175-184.
- Poi de Neiff, A. y Casco, S.L. (2001). Caída de hojas, descomposición y colonización por invertebrados en palmares de la planicie de inundación del río Paraná (Chaco, Argentina). *Interciencia*. 26 (11):567-571.

- Poi De Neiff, A; Neiff, J.J. y Casco, S.L. (2006). Leaf litter decomposition in three wetland types of the Paraná River floodplain. *Wetlands*. 26 (2):558-566.
- Prat, N.; Ríos, B.; Acosta, R. y Rieradevall, M. (2009). Los macroinvertebrados como indicadores de calidad de las aguas. En: Cap. 20. *Macroinvertebrados bentónicos sudamericanos. Sistemática y biología*. (Dominguez, E. y Fernandez, H.R.). Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina. Pp 631-654.
- Pratt, J.R. y Cairns, J.Jr. (1996). Ecotoxicology and the redundancy problem: Understanding effects on community structure and function. En: *Ecotoxicology: A Hierarchical Treatment*. (Newman, M.C. y Jagoe, C.H.). NY.
- Printes, L.B.; Espíndola, E.L. y Fernandez, M.N. (2007). Biochemical biomarkers in individual larvae of *Chironomus xanthus* (Rempel, 1939) (Diptera, Chironomidae). *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* 2: 53-60.
- Prygiel, J.; Rosso-Darmet, A.; Lafont, M.; Lesniak, C.; Durbec, A. y Ouddane, B. (2000). Use of oligochaete communities for assessment of ecotoxicological risk in fine sediment of rivers and canals of the Artois-Picardie water basin (France). *Hydrobiologia*. 410:25-37.
- Rainbow, P. (2002). Trace metals concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Env. Poll.* 120: 497-507.
- Ravera, O. (1989). The enclosure method, concepts, technology and some examples of experiments with trace metals. En: *Aquatic Ecotoxicology: Fundamentals Concepts and Methodologies*. (Boudou, A. y Ribeyre, F.). CRC Press, Boca Raton, FL. Pp 250-271.

- Regaldo, L.; Gagneten, A.M. y Troiani, H. (2009). Accumulation of chromium and interaction with other elements in *Chlorella vulgaris* (Cloroficeae) and *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera). *J. Environ. Biol.* 30 (2), 213-216.
- Resh, V.H. (2008). Which group is best? Attributes of different biological assemblages used in freshwater biomonitoring programs. *Environ. Monit. Assess.* 138: 131-138.
- Reynoldson, T.B.; Thompson, S.P. y Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaeta worm *Tubifex tubifex*. *Environ. Toxicol. Chem.* 10: 1061-1072.
- Reynoldson, T.B.; Rodriguez, P. y Martinez Madrid, M. (1996). A comparison of reproduction, growth and acute toxicity in two populations of *Tubifex tubifex* (Müller, 1774) from the North American Great Lakes and Northern Spain. *Hydrobiología.* 334: 199-206.
- Reynoldson, T.B. y Rodriguez, P. (1999). Field methods and interpretation for sediments bioassessment. En: *Manual of Bioassessment of Aquatic Sediment Quality*. (Murdoch, A.M.; Azcue, J.M. y Murdoch, P.). Lewis Publishers, Boca Raton. Pp. 135-175.
- Rodrigues Capítulo, A. (1999). Los macroinvertebrados como indicadores de calidad de ambientes lóticos en el área pampaena. *Rev. Soc. Ent. Arg.* 58 (1-2): 208-217.
- Rodríguez Capítulo, A.; Tangorra, M. y Ocón, C. (2001). Use of benthic macroinvertebrates to assess the ecological status in Pampean rivers. *Aquat. Ecol.* 35: 109-119.
- Rodríguez Capítulo, A.; Paggi, A. y Ocón, C.S. (2002). Zoobenthic communities in relation with the slope, substrate heterogeneity and urban disturbances in pampean hills streams (Argentina). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 28: 1267-1273.

- Rodriguez, A.; Marchese, M. y Ojea, N. (2002) Efectos del cromo en *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) (Oligochaeta: Lumbricidae): Toxicidad y bioacumulación. *Nat. Neotropicalis*. 33:55-63.
- Rodriguez, P. y Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. En: *Manual of Bioassessment of Aquatic Sediment Quality*. (Mudroch, A.M.; Azcue, J.M. y, Mudroch, P.). Lewi Publishers, Boca Raton, FL. Pp. 83-133.
- Roldán, G. (1999). Los macroinvertebrados y su valor como indicadores de la calidad del agua. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 23: 375-387.
- Roque, F.O; Corbi, J.J. y Trivinho-Strixino, S. (2000). Consideracoes sobre a utilizacao de larvas de Chironomidae (Diptera) na avalacao da qualidade da agua de córregos do Estado do Sao Paulo.. *Ecotoxicología-Perspectiva para o Século XXI*. Rima. San Carlos. Pp.575.
- Rosenberg, D.M. y Resh, V.H. (1993). *Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates*. Chapman & Hall. New York.
- Sarkar, B. (1981). Transport of copper. (Sigel, H.). *Metal ions in biological systems*. Marcel Dekker, New York. Pp 233-281.
- Schindler, D. (1987). Detecting ecosystem responses to anthropogenic stress. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44 (1): 6-25.
- Schubauer-Berigan, M.K.; Monson, P.D.; West, C.W. y Ankley, G.T. (1995). Influence of pH on the toxicity of ammonia to *Chironomus tentans* and *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 14:713–718.

- Segnini, S. (2003). El uso de macroinvertebrados bentónicos como indicadores de la condición ecológica de los cuerpos de agua corriente. *Ecotropicos*. 16 (2): 45-63.
- Servia, M.J.; Péry, A.R.; Heydorff, M.; Garric, J. y Lagadic, L. (2006). Effects of copper on energy metabolism and larval development in the midge *Chironomus riparius*. *Ecotoxicol*. 15: 229-240.
- Simkiss, K. y Taylor, M.G. (1989). Metal fluxes across the membranes of aquatic organisms. *Aquat. Sci*. 1 (2): 173-188.
- Simpson, J. y Norris, R.H. (2000). Biological Assessment of water quality: development of AUSRIVAS models and outputs. *RIVPACS and Similar Techniques for Assessing the Biological Quality of Freshwaters*. Freshwaters Biological Association and Environment Agency, Ableside, Cumbria, UK. Pp: 125-142.
- Smith, M.J.; Kay, W.R.; Edward, D.H.D.; Papas, P.J.; St J. Richardson, K.; Simpson J.C.; Pinder, A.M.; Cale, D.J.; Horwitz, P.H.J; Davis, J.A.; Yung, F.H.; Norris, R.H. y Halse, S.A. (1999). AusRivAS: using macroinvertebrates to assess ecological condition of rivers in Western Australia. *Fresh. Biol*. 41(2): 269–282.
- Somerfield, P.J.; Gee, J.M. y Warwick, R.M. (1994). Soft sediment meiofaunal community structure in relation to a long-term heavy metal gradient in the Fal estuary system *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 105(1-2): 79-88.
- StatSoft, Inc. (2005). STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. Tulsa, USA.
- Strieder, M.N.; Ronchi, L.H.; Stenert, C.; Scherer, R.T. y Neiss, U.G. (2006). Medidas biológicas e índices de qualidade da águas de uma microbacia com poluição urbana e de curtumes no sul do Brasil. *Acta Biolog. Leopoldensia*. 28 (1): 17-24.

- Strixino, S.T. y Strixino, G. (1982). Ciclo de vida de *Chironomus Sancticaroli* Strixino & Strixino (Diptera, Chironomidae). *Rev.Bras. Ent.* 26:183-189.
- Su, Y.; Han, F.X.; Maruthi Sridhar, B.B. y Monts, D.L. (2005). Phytotoxicity and phytoaccumulation of trivalent and hexavalent chromium on brake fern. *Environ. Toxicol. Chem.* 24: 2019-2026.
- Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación Argentina (2004). Nivel Guía para la Protección de la Biota Acuática. *Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua ambiente*. <http://www.hidricosargentina.gov.ar>
- Suedel, B.C.; Deaver, E. y Rodgers, J.H. Jr (1996). Experimental factors that may affect toxicity of aqueous and sediment-bound copper to freshwater organisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 30:40-46.
- Suñe, N.; Sánchez, G.; Caffaratti, S. y Maine, M.A. (2007). Cadmium and Chromium removal kinetics from solution by two aquatic macrophytes. *Environ. Pollut.* 145: 467-473.
- Thienemann, A. (1925). *Die Binnengewässer Mitteleuropas: eine limnologische Einführung*. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. Stuttgart, Germany.
- Tilman, D.; Knops, J.; Wedin, D.; Reich, P.; Ritchie, M. y Siemann, E. (1997). The influence of functional diversity and composition on ecosystem processes. *Science*. 277: 1300-1302.
- Timmermans, K.R.; Peeters, W.; Tonkes, M. (1992). Cadmium, zinc, lead and copper in *Chironomus riparius* (Meigen) larvae (Diptera, Chironomidae): uptake and effects. *Hydrobiologia*. 241:119-134.
- Traunspurger, W. y Drews, C. (1996). Toxicity analysis of freshwater and marine sediments with meio and macrobenthic organisms: a review. *Hydrobiologia*.



328:215-261.

Trivinho-Strixino, S. y Strixino, G. (1995). *Larvas de Chironomidae (Díptera) do Estado de Sao Paulo: Guia de identificação e diagnose dos generos*. Programa de pós-graduação em ecología e recursos naturais. Universidade Federal de Sao Carlos Brasil. Pp.229.

Ulloa Campos, V. (2000). Efectos letales y subletales del cromo y glifosato en *Hyaella curvispina* (Amphipoda) y *Limnodrilus udekemianus* (Oligochaeta) en condiciones de laboratorio. Tesis. Universidad Nacional del Litoral. Pp.28.

United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1973). *Biological field and laboratory methods for measuring the quality of surface waters and effluents*. (Weber, C.I.). Macroinvertebrates. USEPA, Cincinnati, Ohio. Pp 38.

United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1991). Method 200.2. *Sample preparation procedure for spectrochemical determination of total recoverable elements*. Revision 2.3. EPA-600/4-91-010. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

United States Environmental Protection Agency (US EPA) (1991). Method 200.3. *Sample preparation procedure for spectrochemical determination of total recoverable elements in biological tissues*. Revision 1.0. EPA-600/4-91-010. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

United States Environmental Protection Agency (US EPA). (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. 2<sup>nd</sup> ed. Washington, DC.

Van Gestel, C.A y Van Brummelen, T.C. (1996). Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*. 5: 217-225.

- Van Hoof, P.L.; Kukkonern, J.V. y Landrum, P.F. (2001). Impact of sediment manipulation on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons from field-contaminated and laboratory-dosed sediments by an oligochaete. *Environ. Toxicol. Chem.* 20:1752-1761.
- Van Leeuwen, C.J. (1996). Ecotoxicological effects. En: *Risk Assessment of Chemicals: An Introduction*. (Van Leeuwen, C.J. y Hermens, J.L.). Kluwer Academic. London. Pp.175-238.
- Vannote, R.L., Minshall, G.W.; Cummins, K.W.; Sedell, J.R. y Cushing, C.E. (1980). The river continuum concept. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37: 130-137.
- Vatamaniuk, O.K; Bucher, E.A.; Ward, J.T. y Rea, P.A. (2001). A new pathway for heavy metal detoxification in animals. Phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *The J. Biol. Chem.* 276: 20817-20820.
- Verdonschot, P.F. y Nijboer, R.C. (2004). Testing the European stream typology of the Water Framework Directive for macroinvertebrates. *Hydrobiologia.* 516: 35-54.
- Vermeulen, A.C.; Liberloo, G.; Dumont, P.; Ollevier, F. y Goddeeris, B. (2000a). Exposure of *Chironomus riparius* larvae (diptera) to lead, mercury and [beta]-sitosterol: effects on mouthpart deformation and moulting. *Chemosphere.* 41(10): 1581-1591.
- Villar, C. y Bonetto, C. (2000). Chemistry and nutrient concentrations of the lower Paraná River and its floodplain marshes during extreme flooding. *Arch. Hydrobiol.* 148: 461-479.
- Walling, D.E.; He, Q. y Blake, W.H. (2000). River flood plains as phosphorus sinks. En: *The role of erosion and sediment transport in Nutrient and Contaminant Transfer*. (Stone, M.). IAHS Publ. Pp. 211-218.

- Walling, D.E. y Owens, P.N. (2003). The role of overbank floodplain sedimentation in catchment contaminant budgets. *Hydrobiología*. 494: 83-92.
- Walter, C.H.; Hopkin, S.P.; Sibly, R.M. y Peakall, D.B. (2001). *Principles of ecotoxicology*. 2<sup>nd</sup> ed. (Taylor y Francis). London, UK. Pp. 309.
- Warwick, W.F. (1985). Morphological abnormalities in Chironomidae (Diptera) larvae as biological indicators of toxic stress in freshwater ecosystems: Indexing antennal deformities in *Chironomus* Meigen. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42: 1881-1914.
- Washington, H.G. (1984). Diversity, biotic and similarity indices. A review with special relevance to aquatic ecosystems. *Water Res.* 18:653-694.
- Wentzel, R.; Mc Intosh, A. y Anderson, V. (1977). Sediment contamination and benthic macroinvertebrate distribution in a metal-impacted lake. *Environ. Pollut.* 14:187-192.
- Wentzel, R.; Mc Intosh, A. y Mc Cafferty, W.P. (1978). Emergence of the midge *Chironomus tentans* when exposed to heavy metal contaminated sediment. *Hydrobiologia*. 57(3): 195-196.
- Wentworth, C. (1932). A scale of grade and class terms for clastic sediments. *J. Geol.* 30: 377-392.
- White, S.L. y Rainbow, P.S. (1982). Regulation and accumulation of copper, zinc and cadmium by the shrimp *Palaemon elegans*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 8: 95-101.
- Wiederholm, T. (1984). Incidence of deformed chironomid larvae (Diptera:Chironomidae) in Swedish lakes. *Hydrobiologia*. 109:243-249.

- Wiederholm, T.; Wiederholm, A. y Milbrink, G. (1987). Bulk sediment bioassays with five species of fresh-water oligochaetes. *Wat. Air Soil Pollut.* 36:131-154.
- Wilhm, J.F. y Dorris, T.C. (1968). Biological parameters of water quality. *Bioscience.* 18: 447-481.
- Winger, P.V.; Lasier, P.J.; White, D.H. y Seginak, J.T. (2000). Effects of Contaminants in Dredge Material from the Lower Savannah River. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38:128-136.
- Winner, R.W.; Boesel, M.W. y Farrell, M.P. (1980). Insect community structure as an index of heavy-metal pollution in lotic ecosystems. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37: 647-655.
- Woodiwiss, F.S. (1964). The biological system of stream classification used by the Trent river board. *Chem. Ind.* 14: 443-447.
- Woodward, D.F.; Brumhaugh, W.G.; De Lonay, A.J.; Little, E.E. y Smith, C.E. (1994). Effects on rainbow trout fry of a metals-contaminated diet of benthic invertebrates from the Clark Fork River, Montana. *Trans. Am. Fish Soc.* 123: 51-62.
- Wright, D.A. y Welbourn, P. (2002). *Environmental toxicology*. Cambridge University Press, UK. Pp.621.
- Wright, J.F.; Furse, M.T.; y Armitage, P.D. (1993). RIVPACS: a technique for evaluating the biological water quality of rivers in the UK. *Eur. Wat. Pollut. Cont.* 3: 15-25.
- Yap, C.K.; Ismail, A.; Edward, F.B.; Tan, S.G. y Siraj, S.S. (2006). Use of different soft tissues of *Perna viridis* as biomonitors of bioavailability and contamination by heavy metals (Cd, Cu, Fe, Pb, Ni, and Zn) in a semi-enclosed intertidal water, the Johore Straits. *Toxicol. Environ. Chem.* 88: 683-695.

- Yap, C.K.; Ismail, A.; Tan, S.G y Rahim Ismail, A. (2004). Assessment of different soft tissues of the green-lipped Mussel *Perna viridis* (Linnaeus) as biomonitoring agents of Pb: field and laboratory studies. *Water Air Soil Pollut.* 153: 253-268.
- Zilli, F. y Gagneten, A.M. (2005). Efectos de la contaminación por metales pesados sobre la comunidad bentónica de la cuenca del arroyo Cululú (río Salado del Norte, Argentina). *Interciencia.* 30: 159-165.
- Zilli, F.; Montalto, L. y Marchese, M. (2008). Benthic invertebrates diversity patterns and functional feeding groups in the Middle Paraná River Floodplain. *Limnologica.* 38 (2):159-171.