

Mayo, 2016



USAL  
UNIVERSIDAD  
DEL SALVADOR

LICENCIATURA EN  
CIENCIAS AMBIENTALES

*Estudio de la calidad del agua del Arroyo  
Cañuelas mediante un análisis comparativo  
de ensayos toxicológicos con parámetros  
físico-químicos*

Seminario final | Verónica Sykora

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer profundamente a todo el personal del Instituto Nacional del Agua, dado que sin su ayuda esta tesis no hubiese sido posible. Quisiera agradecer en especial a la doctora Ariana Rossen, que fue una fantástica directora de tesis que me guió y ayudó en todo momento y fue un pilar fundamental para desarrollar mi tesis. A Carlos Gómez que me permitió hacer mi pasantía en el Instituto. A Facu, Lean y Samu, que me dieron una ayuda incondicional en el laboratorio y me aclararon pacientemente todas mis dudas. A Sol, Caro, Vale, Barbi, Yani, Lore y Sergio por ayudarme con los problemas que me surgían y acompañarme en el día a día. A Canta, a quién le agradezco por haber ocupado su tiempo en llevarme a muestrear y haber hecho la cámara de incubación de las algas.

Agradezco también al resto del personal del CTUA: a Silvina y su equipo por ayudarme en las determinaciones físico químicas, a Gabi por estar en el muestreo y haberme explicado todo y a Lalo por haberme llevado en el segundo muestreo.

Quisiera agradecer a las chicas del Laboratorio de Nematología de la UBA, en especial a Araceli Clavijo y Eliana por haberme brindado el espacio para realizar los ensayos su laboratorio y haberme ayudado y explicado todos los ensayos.

Por último quisiera agradecer a Sergio Schmidt quién me ayudo y guió en la redacción de este trabajo.

Agradecimientos

Resumen

Objetivos

Introducción

## 1. Generalidades

### 1.1. Cuenca Matanza- Riachuelo

1.1.1. Características de la cuenca

1.1.2. Relieve

1.1.3. Hidrología

1.1.4. El Arroyo Cañuelas y su subcuenca

1.1.5. Servicios ecosistémicos del arroyo Cañuelas

### 1.2. Análisis de calidad de agua

1.2.1. Parámetros físico-químicos

1.2.2. Análisis ecotoxicológicos

1.2.2.1. Conceptos importantes en ecotoxicología

### 1.3. Antecedentes

## 2. Metodología

### 2.1. Muestreo

#### 2.1.1. Sitios de muestreo

2.1.1.1. Arroyo Cañuelas 1

2.1.1.2. Arroyo Cañuelas y Ruta 205

2.1.1.3. Arroyo Cañuelas 2

2.1.1.4. Arroyo Cañuelas

### 2.2. Análisis físico-químicos

### 2.3. Ensayos ecotoxicológicos estandarizados

2.3.1. *Lactuca sativa*

2.3.2. *Caenorhabditis elegans*

2.3.3. *Pseudokirchneriella subcapitata*

## 3. Resultados

### 3.1. Determinaciones fisicoquímicas

3.2. Ensayos realizados con semillas de lechuga *Lactuca sativa*.

3.3. Ensayos realizados con nematodos *Caenorhabditis elegans*.

3.4. Ensayos realizados con algas *Pseudokirchneriella subcapitata*.

3.5. Análisis conjunto de los resultados

Conclusiones

Bibliografía

Anexo

## RESUMEN

El Arroyo Cañuelas ubicado en la provincia de Buenos Aires, Argentina, es un arroyo que recibe contaminantes tanto agroindustriales como cloacales que deterioran la calidad de sus aguas. Este arroyo a su vez, constituye un ecosistema importante para su conservación ya que alberga los últimos remanentes de la flora y fauna nativa de la cuenca Matanza Riachuelo. El objetivo de este trabajo es caracterizar la calidad del agua del Arroyo Cañuelas mediante determinaciones fisicoquímicas y 3 ensayos de toxicidad estandarizados realizados con lechuga (*Lactuca sativa*), nematodos (*Caenorhabditis elegans*) y algas (*Pseudokirchneriella subcapitata*). Los resultados de este trabajo muestran que, si bien se detecta una leve recuperación de la calidad del agua a lo largo del trayecto estudiado, en general se evidencia una muy mala calidad del arroyo, la cual se reflejó tanto en los ensayos fisicoquímicos como toxicológicos. El trabajo también muestra la utilidad de los ensayos ecotoxicológicos como herramientas para la gestión de recursos hídricos.

## **OBJETIVOS**

Caracterizar la calidad del agua del Arroyo Cañuelas mediante determinaciones fisicoquímicas y ensayos ecotoxicológicos estandarizados.

## INTRODUCCIÓN

El Río Matanza-Riachuelo es uno de los lugares más contaminados del mundo (Instituto Black Smith y Cruz Verde Suiza, 2003) y el curso de agua más contaminado de la Argentina (Quaíni, 2011). Su deterioro inició a principios del siglo XIX cuando se instalaron en sus márgenes los primeros mataderos, saladeros y curtiembres. Con el pasar de los años las fuentes de contaminación se fueron modificando, y la calidad del curso de agua y sus afluentes fue empeorando. Actualmente, el Río Matanza-Riachuelo atraviesa la zona más urbanizada e industrializada de la República Argentina, lo cual produce un severo impacto sobre el curso de agua principalmente por los desechos cloacales, industriales y agrícola-ganaderos que en él se vierten. Tanto por el histórico deterioro de sus aguas como por su importancia social y económica, el Río Matanza-Riachuelo es un curso de agua de gran interés para su estudio.

Históricamente el Río Matanza-Riachuelo atravesó múltiples intentos de remediación pero sin resultados concretos. En el año 2006, a raíz de una demanda vecinal contra diferentes actores gubernamentales, se crea la Autoridad Cuenca Matanza Riachuelo (ACUMAR). El territorio de acción de este ente es la cuenca del río, la cual comprende toda el área donde las aguas provenientes de las precipitaciones escurran hacia el Río. Los tres objetivos principales de la ACUMAR son: recomponer el ambiente, prevenir el daño sobre el mismo, y mejorar la calidad de vida de los habitantes de la cuenca (ACUMAR, 2010).

Para lograr estos objetivos, en lo que a cursos de agua superficiales se refiere, la ACUMAR ha fijado niveles guía para los diferentes usos del agua, entendidos como valores recomendables de calidad de agua. El uso IV para actividades recreativas pasivas es el que se emplea para la gestión de la cuenca (Res. ACUMAR N°03/09). El trabajo realizado por ACUMAR permitió conformar una amplia base de datos fisicoquímicos sobre los cursos de agua y los efluentes que en ellos se vuelcan. Sin embargo, dada la inmensa variedad de sustancias que ingresan a los ecosistemas acuáticos, resulta cada vez más complejo y costoso realizar una caracterización química amplia de los cuerpos de agua (Barbério, 2013).

Los ensayos ecotoxicológicos, por su parte, son sensibles a diversas sustancias y permiten observar el efecto conjunto de mezclas complejas en los sistemas biológicos. Por lo tanto, estos ensayos pueden utilizarse como una herramienta complementaria para los ensayos fisicoquímicos tradicionales alertando sobre los sitios cuyas aguas sean tóxicas para ciertos organismos para luego hacer un examen más exhaustivo en los mismos (Bohórquez-Echeverry *et al.*, 2007). Este análisis conjunto entre parámetros fisicoquímicos y ecotoxicológicos permitiría establecer relaciones causa-efecto entre los elementos presentes en los cursos de agua y su efecto en la biota (Boudouet *al.*, 1997) (Serpa *et al.*, 2014).

A pesar de la utilidad de los ensayos ecotoxicológicos, los mismos no se implementan en forma rutinaria debido principalmente a la falta de legislación sobre la temática.

El presente trabajo se realizó en el Arroyo Cañuelas que se encuentra en la parte alta de la Cuenca Matanza Riachuelo y recibe contaminantes de fuentes agroindustriales, urbanas y domésticas (ACUMAR, 2013). Actualmente el arroyo alberga los últimos remanentes de flora y fauna nativa de la cuenca. Además, el crecimiento demográfico y el desarrollo urbano presente en su cuenca (González, 2012) podrían afectar la hidrología y empeorar aún más la calidad de las aguas del Arroyo Cañuelas.

Respecto del nivel guía establecido por la ACUMAR para el uso IV, los parámetros normalizados podrían resultar muy permisivo para la calidad registrada en el Arroyo Cañuelas. Por lo que el aporte de los ensayos ecotoxicológicos podrían complementar la descripción y caracterización de la calidad del agua del Arroyo Cañuelas.

En general La caracterización ecotoxicológica emplea diversos bioensayos con organismos de diferentes niveles tróficos (EPA). Para este trabajo se utilizarán ensayos estandarizados con lechuga (*Lactuca sativa*), nematodos (*Caenorhabditis elegans*) y algas (*Pseudokirchneriella subcapitata*).

Este trabajo también pretende ser un aporte para el desarrollo de planes de monitoreo que utilicen ensayos toxicológicos para una mejor caracterización de los cuerpos de agua, a fin de que pueda ser utilizado por diferentes organismos gubernamentales para la gestión de recursos hídricos.

# 1. GENERALIDADES

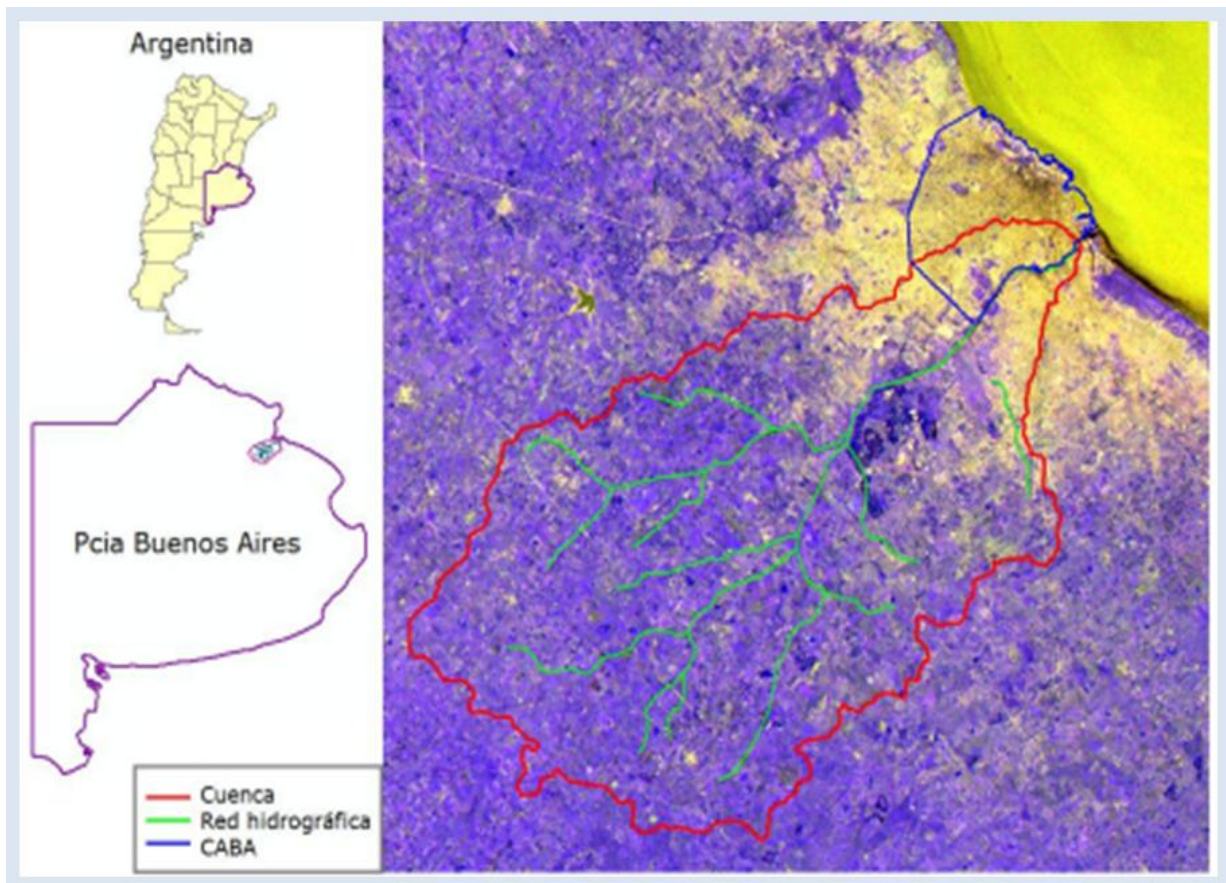
## 1.1. Cuenca Matanza-Riachuelo

### 1.1.1. Características de la cuenca

Se denomina cuenca hídrica a un área geográfica en la cual el agua proveniente de las lluvias escurre a través del terreno hasta un determinado punto de vuelco o desembocadura que puede ser un río, lago o mar. El límite de la cuenca está definido naturalmente por las partes más altas del área que rodea el río llamadas líneas divisorias de agua.

En el caso de la Cuenca Matanza Riachuelo, ubicada en el área metropolitana de la provincia de Buenos Aires, Argentina (Figura: 1.1.1.1.), el agua confluye en un río llamado Matanza en sus orígenes y Riachuelo en su tramo inferior, desde el punto en el que la Capital Federal es ribereña. El río Matanza-Riachuelo recibe el aporte de numerosos arroyos, 232 cursos de agua, aunque sólo tres arroyos son principales: Rodríguez, Morales y Cañuelas (ACUMAR, 2010).

Figura 1.1.1.1.: Mapa de la ubicación de la Cuenca Matanza Riachuelo.



Fuente: (Quáini, 2011).

La cuenca Matanza- Riachuelo se divide en 3 sectores: cuenca alta, media y baja. Esta división responde a razones geográficas, económicas, políticas, sociales y a las diversas problemáticas que sufren las regiones. Los arroyos de la cuenca alta tienen una modificación antrópica que aumenta hacia la cuenca media y es máxima en la cuenca baja. En la cuenca alta los cuerpos de agua discurren sin dificultades, sólo se han construido algunos canales para orientar el escurrimiento

disperso. En la cuenca media estos cursos están algo más modificados dado que se observan algunos arroyos cortados, profundización del cauce y acumulación de tierra en las márgenes. En la cuenca baja el río se encuentra rectificado y canalizado perdiendo sus características naturales (Malpartida, 2004; Faggi, 2015).

### 1.1.2. Relieve

La cuenca Matanza-Riachuelo presenta un relieve predominantemente llano con suaves ondulaciones y reducida pendiente en dirección SO-NE. La cota máxima de la cuenca es de 38 msnm y la mínima es de 3 msnm, en base al sistema de referencia del Instituto Geográfico Militar. En las zonas más altas, donde se ubican las nacientes de los ríos y arroyos que desembocan en el Matanza-Riachuelo, el terreno cuenta con un buen drenaje y un escurrimiento normal. Por el contrario, las zonas más bajas presentan un drenaje muy pobre debido a la pendiente mínima del terreno y a la capa de arcillas en el sustrato, situaciones que favorecen el anegamiento.

El río Matanza-Riachuelo es un típico río de llanura caracterizados por: un escaso caudal permanente, de  $8 \text{ m}^3/\text{s}$  en promedio; una baja pendiente, de 0,35%; un recorrido del agua sinuoso, lo que genera meandros y lagunas; y un amplio valle de inundación. Este valle natural del Matanza-Riachuelo que debiera ser un área anegadiza entre los 5 y 0 msnm actualmente ha sido rellenado y urbanizado. Las barracas que limitaban el fondo del valle todavía son visibles en Parque Lezama o al sur de la estación de ferrocarriles Constitución (Quáini, 2011).

### 1.1.3. Hidrología

En la cuenca Matanza Riachuelo la circulación normal de las masas de agua ha sido fuertemente modificada por el hombre. Como se mencionó anteriormente las precipitaciones dentro de la cuenca escurren superficialmente hacia el Río Matanza-Riachuelo, el cual desemboca luego en el Río de la Plata. Sin embargo, otra porción del agua que precipita puede evaporarse o infiltrarse en el suelo llegando a la napa freática, la cual está en contacto con la atmósfera a través de un sedimento permeable. Tanto el agua superficial como el agua subterránea freática fluyen, las últimas más lentamente, en el sentido de las pendientes y hacia las mismas depresiones, como lagos, ríos u el océano. Por lo tanto, los cauces de la región tienen un régimen hídrico mixto.

La manera en la que se mezclan el agua de los ríos y el agua subterránea depende de la altura a la que se encuentre una masa de agua con respecto a la otra. Ocurre que en época de lluvia, los ríos de llanura elevan el nivel habitual de sus cauces quedando el nivel de agua de los acuíferos freáticos circundantes más bajo. A medida que pasa el tiempo el agua comienza a filtrarse por medios de los poros del suelo y del sedimento en los acuíferos subterráneos, generando la recarga de los mismos. Cuando ocurre esto, se dice que los cauces son influentes hacia los acuíferos.

El movimiento de agua inverso se da cuando durante períodos de sequía el nivel de agua en los cauces de los ríos es menor al nivel freático circundante y por los mismos procesos de infiltración y comunicación el agua freática fluye hacia los cauces. En estos casos se dice que el cauce es efluente hacia el acuífero.

Normalmente los cursos de la cuenca del Matanza- Riachuelo tienen niveles superiores a los de la freática sólo durante las lluvias y hasta poco tiempo después del cese de las mismas, es decir son influentes mientras se evacuan los excedentes hídricos superficiales generados. Fuera de esas

épocas de lluvia se comportan como efluentes y por ello prácticamente toda el agua que por ellos circula proviene de los niveles freáticos (Malpartida, 2004).

El conocimiento de la dinámica bimodal (influyente - efluente) entre el agua superficial y subterránea es importante para entender cómo un cuerpo de agua superficial puede contaminar un acuífero o viceversa.

#### 1.1.4. El Arroyo Cañuelas y su subcuenca

Los arroyos estudiados en este trabajo se encuentran emplazados en el Partido de Cañuelas. Históricamente la actividad principal en esta área fue agrícola ganadera, formando parte de la denominada “cuenca del abasto” compuesta por 18 partidos que rodea el área metropolitana (Casal, 2004). Sin embargo, en las últimas décadas ha habido un incremento poblacional (INDEC, 2010) dando lugar a usos de la tierra no agropecuarios. Este aumento poblacional concuerda con las tendencias del área bonaerense, en donde la población ha aumentado siguiendo las vías férreas. El incremento poblacional también se explica por la existencia otras vías de comunicación, como la Autopista Ezeiza- Cañuelas, por su cercanía con el área metropolitana de Buenos Aires, y la aparición de nuevos sectores sociales que buscan un ambiente urbano en contacto con la naturaleza. Esta tendencia demográfica genera una valorización de los suelos y un subsiguiente abandono de la agricultura (Gonzales, 2012).

Dado que los arroyos estudiados en este trabajo, A. Cañuelas y A. Navarrete, fluyen cerca de dos centros urbanos, Cañuelas y Spegazzini, y bordeando vías de tránsito, la Ruta Nacional 205 en el caso de A. Cañuelas, es de esperar que en sus cuencas se dé un cambio en el uso del suelo que afecte a los cursos de agua disminuyendo en ellos los contaminantes agrícola ganaderos y aumentando los contaminantes de origen doméstico, sumado a los actuales contaminantes industriales.

#### 1.1.5. Servicios ecosistémicos del Arroyo Cañuelas

La visión predominante sobre los arroyos urbanos y periurbanos que se han tenido históricamente, sumado a los actuales cambios en el uso del suelo en los alrededores del Arroyo Cañuelas sugieren que este ecosistema es susceptible a ser degradado. La importancia de su conservación se debe tanto a su valor intrínseco como a los servicios ecosistémicos que este nos provee. Los servicios ecosistémicos son definidos por La Evaluación de los Ecosistemas del Milenio (World Resources Institute, 2005) como “Los beneficios que las personas obtienen de los ecosistemas”. Según (Gaspari *et al.*, 2013) los servicios de las cuencas hidrográficas se pueden clasificar en:

- Hidrológicos: Regulación del ciclo hidrológico mediante la recepción y almacenamiento del agua de las precipitaciones, y su posterior descarga como escurrimiento.
- Ecológicos: Provisión de hábitat para diferentes especies de flora y fauna. Mantención de la biodiversidad y bancos de germoplasma. Función de biocorredores, permitiendo el flujo de la flora y la fauna.
- Ambientales: Regulación de los ciclos biogeoquímicos, purificación del agua y tratamiento de residuos.
- Socioeconómicos: Provisión de oportunidades para actividades recreativas, valor estético, oportunidades de educación formal y no formal.

A continuación se detalla la situación de estos servicios ecosistémicos para el caso del Arroyo Cañuelas.

### Servicios hidrológicos

La capacidad de regulación del ciclo hidrológico del Arroyo Cañuelas es susceptible a debilitarse debido al aumento de la urbanización y la impermeabilización de las zonas aledañas debido a la pavimentación y las construcciones. El aumento de áreas impermeables reduce la infiltración de las precipitaciones, y aumenta los caudales a evacuar. Por lo que, en el caso de que los desagües pluviales se descargaran en el arroyo, su caudal aumentaría durante las precipitaciones más abruptamente que en sus condiciones naturales (Dourojeanni, *et al.*, 1999). Esto facilita las inundaciones y aumenta el desplazamiento de aguas contaminadas (Romero, 2005).

Otros cambios en la hidrología del arroyo pueden producirse por estructuras como puentes, canalizaciones, rectificaciones de cauces, etc., las cuales están asociadas al desarrollo urbano y alteran la geomorfología del cauce de manera irreversible.

Los desniveles provocados por terraplenes de rutas o de ferrocarriles también alterarían los ciclos hidrológicos naturales. Esto se debe a que las cuencas emplazadas en terrenos llanos son especialmente sensibles a los cambios artificiales, ya un desnivel de un metro en lugares de escasa pendiente significa una barrera infranqueable desde el punto de vista hidrológico (Zimmerman *et al.*, 2000).

### Servicios Ecológicos:

La zona de la cuenca Matanza-Riachuelo pertenece a la ecoregión de Pastizales Pampeanos según el Anexo I del Convenio de Biodiversidad Biológica. Dentro de la cuenca, las zonas de riberas se destacan por ser zonas de alta biodiversidad (Faggi, 2015).

En la cuenca Matanza Riachuelo, la vegetación natural ha sido fuertemente modificada por el hombre. La mayor variedad de especies nativas se encuentra en la cuenca alta, encontrándose en la cuenca media y alta una predominancia de gramíneas y árboles exóticos. En la cuenca, los ríos son bordeados por bosques en galerías, o por juncos, totoras y duraznillos como también sucede en áreas bajas o anegadas. Cabe destacar que la vegetación ribereña del Arroyo Cañuelas se encuentra con un buen estado de conservación y provee importantes servicios ecosistémicos dado que protege las riberas y provee de hábitat a la fauna. Actualmente, esta vegetación está siendo degradada por el desmalezamiento periódico ([www.cañuelas.gov.ar](http://www.cañuelas.gov.ar)).

En cuanto a la fauna, la mayor parte de los mamíferos ha desaparecido por causas antrópicas encontrándose mayoritariamente roedores y marsupiales y en menor medida mamíferos carnívoros (ACUMAR, 2013). La mayor variedad de especies de aves fue encontrada en la cuenca alta, dado que la falta de un ambiente urbano evita la proliferación de unas pocas especies exóticas, como las palomas y gorriones. Dentro de la cuenca alta la riqueza específica es mayor en zonas de cuerpos de agua y ganadería extensiva que en las zonas de monocultivo y urbanización baja (Faggi, 2015). Al igual que con las aves, la mayor variedad de especies de peces también se encuentra en la cuenca alta. La variedad interespecífica y abundancia de peces es nula en la naciente del arroyo cañuelas dado su escaso caudal, luego van en aumento hasta ser máxima en la confluencia con el Arroyo Navarrete para luego disminuir río abajo (ILPLA, 2015) posiblemente debido al descenso en la calidad del agua.

## Ambientales

En los ríos existen diversos procesos biológicos, físicos y químicos que permiten recuperar la calidad original de las aguas, algunos de estos procesos son: la sedimentación, dilución, reacciones de hidrólisis u oxidación, la ingesta de materia disuelta o particulada. A esta capacidad de los sistemas naturales de eliminar contaminantes se la llama autodepuración (Heidenwag *et al.*, 2001).

La capacidad autodepuradora de los ríos, sin embargo, puede verse saturada (Luna, 2002), más aún con el poco caudal y gran tiempo de permanencia del Arroyo Cañuelas. Los procesos de urbanización descritos anteriormente, pueden aumentar la cantidad de contaminantes en el río afectando la calidad del agua. Estos contaminantes pueden provenir de fuentes puntuales, como alcantarillas, o difusas como: basura, polvo, lavado de contaminantes de pozos sépticos y alcantarillas, etc. (Dourojeanni *et al.*, 1999). A su vez, la remoción de la vegetación ribereña y su zona circundante aumentaría los contaminantes de la escorrentía y el viento que antes eran removidos por estos elementos (Bentrup, 2008).

## Socioeconómicos

El Arroyo Cañuelas podría beneficiar a la sociedad por un valor paisajístico o recreativo. Sin embargo, la degradación actual del río y sus riberas provoca que estos no puedan proveer dichos servicios. La degradación del río es visible por su mala calidad del agua y el olor fétido de la misma. Según un estudio (Menendez, 2015) el mal olor es la principal razón por la cual las personas no quieren asentarse cerca de los arroyos, convirtiéndose en zonas marginales con escaso valor social, lo que produce a su vez mayor degradación del río.

### **1.2. Análisis de calidad de agua**

Calidad de agua es un término utilizado para expresar la idoneidad del agua para diferentes usos o procesos. Por lo tanto este concepto es relativo, dependiendo del uso que se le dará al recurso. Cada uso requerirá ciertas características físicas, químicas o biológicas.

La calidad del agua puede ser modificada naturalmente, por influencias geológicas, hidrológicas o climáticas; o antrópicamente, cuando estas modificaciones sean deletéreas para el ambiente acuático serán calificadas como contaminantes. Entonces para estudiar el efecto de la contaminación en un ambiente se debe conocer las características del agua pre-polución, o en su defecto establecer como referencia un cuerpo de agua no contaminado cuyas características naturales sean similares al cuerpo de agua estudiado (OMS, 1996).

En la normativa, los parámetros que definen la calidad del agua se pueden establecer de tres maneras (Castillo, 2004):

- Como nivel guía de calidad: Este es un valor numérico de concentración límite o indicación narrativa, con base científica, recomendado para proteger y mantener organismos nativos o un cuerpo de agua para un uso específico.
- Como objetivo de calidad: Este refleja las condiciones oficiales deseadas para una determinada región.

- Como estándar de calidad: Este es un objetivo que ha sido reconocido y es aplicado por legislación de control ambiental a escala gubernamental.

### 1.2.1. Parámetros fisicoquímicos

Las propiedades físicas del agua son las que definen las características del agua que responden a los sentidos de la vista, del tacto, gusto y olfato, como pueden ser los sólidos suspendidos, turbiedad, color, sabor, olor y temperatura. Por otro lado, los parámetros químicos están relacionados con la capacidad del agua para disolver diversas sustancias, entre las que podemos mencionar los sólidos disueltos totales, alcalinidad, dureza, fluoruros, materia orgánica, metales y nutrientes (Arellano,2002).

La combinación más simple de parámetros para un análisis de calidad comprende: la temperatura, conductividad, pH, oxígeno disuelto y sólidos suspendidos totales. Luego, los programas de monitoreo pueden medir más variables, incluyendo normalmente metales y compuestos orgánicos (OMS, 1996).

**Tabla 1.2.1.1:** Niveles guía que han sido aplicados al Arroyo Cañuelas.

Parámetro	Abreviatura	Unidades de medición	ACUMAR Usos de calidad de agua		Niveles guía Municipalidad de Cañuelas
			Uso IV Actividades recreativas pasivas	Uso V Preservación de la vida acuática	
Oxígeno disuelto	OD	mg/L	>2	> 5	> 5
Demanda Biológica de Oxígeno	DBO	mg/L	<15	< 3	< 3 mg/L
Demanda química de oxígeno	DQO	mg/L	-	-	<5 mg/L
Conductividad	CE	μS/cm	-	-	-
Potencial Hidrógeno	pH	upH	6-9	6-9	6,5-9
Potencial de óxido-reducción	ORP	mV	-	-	-
Temperatura	Temp.	°C	<35	<3 + TEMPERATURA DE FONDO	-
Nitrógeno total	N <sub>total</sub>	-	-	-	-
Nitrógeno total	NTK	mg/L	-	-	-

Kjeldahl					
Nitrógeno amoniacal	N-NH <sub>3</sub>	mg/L	-	<0,6	-
Nitritos	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	mg/L	-	-	< 0,06
Nitratos	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	mg/L	-	-	-
Fósforo total	PT	mg/L	<5	< 0,01	< 0,025
Sulfuros	S	mg/L	<1	< 0,002	-

Fuente: Resolución interna de ACUMAR n° 003/09, anexo 1 e informe 07/11: Arroyo Cañuelas del Laboratorio de Aguas de la Dirección Provincial de Saneamiento y Obras Hidráulicas (DiPSOH, 2011) para la Municipalidad de Cañuelas.

A continuación se explican brevemente los parámetros medidos para el presente trabajo:

### Oxígeno disuelto

El oxígeno disuelto (OD) es el oxígeno (O<sub>2</sub>) presente en solución acuosa. Este es un requisito nutricional esencial para la mayoría de los organismos vivos, en especial peces, dado a que es utilizado en el proceso de respiración aeróbica. El oxígeno disuelto se genera por la mezcla del oxígeno atmosférico con el agua o durante la fotosíntesis de las plantas acuáticas. A su vez, el oxígeno disuelto presente en el agua es consumido por algunos organismos para la degradación de la materia orgánica (oxidación biológica) (ACUMAR, 2011).

La solubilidad del oxígeno en el agua depende de 3 factores: la temperatura, la presión atmosférica y la salinidad. La salinidad disminuye la concentración de oxígeno disuelto ya que las sales disueltas reducen los espacios intermoleculares para la disolución de los gases. La relación del OD con los otros dos factores está explicada por la ley de Henry y Dalton la cual dice que “la solubilidad de un gas en un líquido es directamente proporcional a la presión parcial e inversamente proporcional a la temperatura”. Por lo que, a mayor altitud y menor temperatura (por ejemplo en invierno), habrá mayor oxígeno disuelto en el agua. En condiciones ideales existe una relación fija entre el oxígeno disuelto, la temperatura y la presión que puede ser interpretada con un monograma (Massol-Deyá, 2002).

Esta relación ideal puede ser afectada por los procesos de fotosíntesis y respiración. La fotosíntesis aumenta conforme aumenta la radiación solar, por lo que se suelen encontrar valores máximos diarios de OD luego del mediodía. Por otra parte, la respiración de los organismos vivos y el número de bacterias aumenta con la temperatura. Algunas sustancias también afectan los niveles esperados de OD. Las grasas e hidrocarburos alteran la interfaz atmosfera – agua, mientras que la materia orgánica oxidable disminuye el oxígeno disuelto ya que los organismos lo utilizan para degradarla.

La concentración de OD se puede expresar en miligramos por litro (mg/L) o en porcentaje de saturación (%). La primera de las opciones expresa directamente la masa de oxígeno por litro de agua, mientras la segunda se expresa el nivel de oxígeno presente en la muestra en comparación con el nivel de oxígeno en saturación esperable para la temperatura y presión dada. El porcentaje de saturación se utiliza para describir cualitativamente la calidad del agua, las aguas superficiales pueden contener cantidades relativamente importantes próximas a la saturación. La USEPA (*United*

States Environmental Protection Agency) define una concentración mínima de 5 mg/L para el mantenimiento de la biota, muchos estados de EE.UU. optaron por un límite menos estricto de 4 mg/L, la USEPA define como crisis biótica a concentraciones  $\leq 3$  mg/L (Bain, 1999). Las normas europeas indican una concentración límite máxima apropiada de 5 mg/L (Rodier, 1998).

Para la interpretación de la calidad del agua en función del porcentaje de saturación de oxígeno (Lynch y Poole, 1979 citado por Massol-Deyá, 2002) establece:

**Tabla 2.1.2: Porcentaje de saturación de oxígeno.**

Calidad	% de saturación de OD
Buena	$\geq 90$
Regular	89-75
Dudosa	74-50
Contaminada	$<50$

### Materia orgánica

#### Demanda biológica de oxígeno

La Demanda Bioquímica de Oxígeno ( $DBO_5$ ) de un líquido es la cantidad de oxígeno que los microorganismos descomponedores consumen para la degradación de la materia orgánica contenida en la muestra en un plazo de 5 días a una temperatura de 20° C. Dado que cuanto mayor sea la cantidad de materia orgánica contenida en la muestra mayor será la cantidad de oxígeno necesaria para degradarla, la DBO es una medida indirecta de la cantidad de materia orgánica biodegradable presente en una muestra (ACUMAR, 2011).

En zonas contaminadas, la DBO puede ser de varios  $O_2$ mg/L, lo que, en límites razonables puede ser favorable para la vida acuática. En otras ocasiones, las aguas contaminadas presentan valores pequeños de DBO debido a la presencia de tóxicos inhibidores del crecimiento microbiano (Rodier, 1998).

#### Demanda química de oxígeno

La demanda química de oxígeno (DQO) es un parámetro que mide la cantidad de oxígeno requerido por los cuerpos reductores presentes en el agua para oxidar toda la materia inorgánica u orgánica, biodegradable o no, presente en una muestra de agua. Se utiliza para medir el grado de contaminación y se expresa en miligramos de oxígeno por litro ( $mg O_2/L$ ).

Dado que la DQO aumenta con la presencia de sustancias de difícil o imposible biodegradación que no alteran la DBO, los valores de DQO son siempre mayores a los de DBO en una muestra de agua específica (ACUMAR, 2011).

### Índice de biodegradabilidad

Mediante la correlación entre la DBO<sub>5</sub> y la DQO es posible conocer qué proporción de los compuestos presentes en el agua son biodegradables. Para esta correlación se divide la DBO<sub>5</sub> por la DQO, siendo los valores más cercanos a 1 indicativos de mayor proporción de materia biodegradable.

A partir de la relación DBO<sub>5</sub>/ DQO se puede generar lo que se denomina Índice de Biodegradabilidad. El índice propuesto por Martínez Soza (2010) es:

**Tabla 1.2.1: Índice de biodegradabilidad.**

Valor de DBO <sub>5</sub> /DQO	Caracterización de la muestra
< 0,2	Poco biodegradable.
0,2-0,4	Biodegradable
> 0,4	Muy biodegradable

Fuente: Srinivas, 2008

### Conductividad eléctrica

Es la capacidad de una sustancia o mezcla de sustancias para transmitir la corriente eléctrica y se expresa en Siemens/cm (S/cm). Es una medida de los electrolitos presentes en el agua y permite evaluar rápida, pero muy aproximadamente la mineralización global del agua (Massol-Deyá, 2002) (Rodier, 1998).

La conductividad del agua natural dependerá del terreno que atraviesa y por la posibilidad de disolución de las rocas y materiales. A su vez, esta disolución dependerá de todos los factores que pueden afectar la solubilidad de un soluto en agua (tiempo de disolución, temperatura, tipo de sales, etc.). Valores de conductividad anormalmente altos podrían evidenciar un vertido de efluentes industriales, ya que estos poseen lógicamente valores más altos que las aguas más puras (Marín Galvin, 2003).

Dado que los valores naturales de conductividad de los cuerpos de agua son específicos para cada cuerpo de agua, no se encontraron niveles guía para este parámetro. Sin embargo, se encontró que los valores de conductividad en otros estudios del Arroyo Cañuelas (DiPSOH, 2011) fueron: 496  $\mu$ S/cm en el punto no contaminado, 5794  $\mu$ S/cm en el sitio de descarga de efluentes, y 1959  $\mu$ S/cm río abajo, en una zona de contaminación intermedia. Estos valores serán usados como niveles de referencia para este trabajo.

### pH

El pH es el acrónimo para potencial de hidrógeno, e indica la concentración del ión hidronio en una solución. El pH de las aguas naturales se define principalmente por la naturaleza de los terrenos atravesados, aumentando por ejemplo en aguas calcáreas. El valor de pH compatible con la vida está entre 5-9 upH (Bain, 1999; Rodier, 1998).

Este parámetro es importante cuando queremos determinar la especiación química y solubilidad de varias sustancias orgánicas e inorgánicas en agua. Además las variaciones de pH tienen un efecto marcado sobre la biota y de su valor dependen (Barrenechea Martel, 2004):

- Los procesos biológicos regulados por enzimas (ej. Fotosíntesis, respiración).
- La biodisponibilidad de nutrientes esenciales.
- La movilidad de metales pesados, que pueden ser tóxicos desde bajas concentraciones.
- El funcionamiento de macromoléculas y organelos (ej. Proteínas estructurales, sistemas de pared celular y membranas).

### Potencial de óxido reducción

El potencial de óxido reducción (POR) será denominado en este trabajo por sus siglas en inglés (ORP) por ser mayormente utilizado en el ámbito de competencia. Este parámetro determina la capacidad de un sistema o ambiente de oxidarse (donar electrones) o reducirse (aceptar electrones) y se mide contra el punto 0 de un electrodo normal de hidrógeno u otro electrodo secundario de referencia (Massol-Deyá, 2002). Un ORP positivo es indicativo de un sistema que favorece las reacciones de oxidación, abundante en compuestos oxidados, con apreciable cantidad de oxígeno y generalmente, fuertemente mineralizada. Por el contrario, un ORP negativo evidencia un ambiente reductor que contendrá abundantes compuestos en estado reducido, apenas oxígeno y sí sulfuros, amoníaco y materias orgánicas difícilmente mineralizables (Marín Galvin, 2003).

### Temperatura

La temperatura es uno de los parámetros físicos más importantes del agua dado que regula procesos vitales para los organismos vivos y afecta las propiedades físicas y químicas de otros factores abióticos (Massol-Deyá, 2002). Las variaciones en este parámetro pueden modificar (Barrenechea Martel A., 2004):

- La solubilidad de gases (por ejemplo el oxígeno) y de moléculas orgánicas o inorgánicas (por ejemplo compuestos xenobióticos).
- La cinética de las reacciones químicas.
- El metabolismo de los seres vivos (un aumento de la temperatura acelera el metabolismo microbiano o dificulta el proceso fotosintético a intensidades de luz altas).
- Parámetros físicos como el pH, la viscosidad y la tensión superficial del agua.

Los cambios anormales en las temperaturas de las aguas superficiales se producen mayoritariamente por las centrales térmicas y menor medida por otras fuentes de contaminación. Las variaciones en la temperatura pueden ser benéficas o perjudiciales para el ecosistema dependiendo el caso. Por ejemplo, un aumento en la temperatura favorece la autodepuración y favorece la sedimentación, como así puede propiciar el desarrollo de microorganismos patógenos o producir una mortandad de peces (Rodier, 1998).

### Nitrógeno

El nitrógeno es un nutriente necesario para todos los organismos que lo utilizan para sintetizar proteínas, ácidos nucleicos y otros compuestos orgánicos. Dado que en presencia de fósforo el nitrato es un factor limitante para el crecimiento de organismos fotosintéticos, su presencia

contribuye a la eutrofización de los cuerpos de agua. Además, este es un parámetro importante en los análisis de calidad de agua dado que algunas especies de nitrógeno pueden ser tóxicas para organismos acuáticos y humanos (Camaro y Alonso, 2007).

Las fuentes más importantes de nitrógeno son: la degradación natural de la materia orgánica; los efluentes industriales provenientes por ejemplo de la industria química o agro alimentaria; aguas servidas, las cuales contienen orina que es abundante en nitrógeno, y diferentes compuestos provenientes de la industria agrícola ganadera, como los fertilizantes nitrogenados los cuales llegan a los cursos de agua superficiales por la escorrentía de las precipitaciones (Massol-Deyá, 2002).

Para el análisis de calidad de agua resulta útil medir la concentración de las diferentes especies de nitrógeno presentes en el agua (British Columbia Ministry of Environment, 1998).

- Nitrógeno amoniacal

El amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) presente en el agua proviene mayormente de la degradación parcial de la materia orgánica. En los cursos de agua el amonio o amoniaco ionizado se encuentra en equilibrio con el amoniaco no ionizado ( $\text{NH}_3$ ). Este último aumenta conforme aumenta el pH y temperatura del agua y es apreciablemente más tóxico, en especial para los peces, que el amonio.

En condiciones aeróbicas, en aguas con oxígeno disuelto, el amonio sufre un proceso de nitrificación, oxidándose a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ). En la segunda etapa de nitrificación el ión nitrito se oxida a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Dado que en presencia de fósforo, el nitrato es un factor limitante para el crecimiento de organismos fotosintéticos, su presencia contribuye a la eutrofización de los cuerpos de agua (Marín Galvin, 2003).

- Nitrógeno Total de Kjeldahl

El NTK no es ningún compuesto químico del nitrógeno, ni tampoco representa la totalidad del nitrógeno en agua, sino que mide al conjunto de nitrógeno orgánico y sus formas amoniacales. Niveles altos de nitrógeno total son indicadores de una contaminación orgánica reciente, dado que el nitrógeno no se encuentra totalmente degradado. El nitrógeno orgánico no está biodisponible para las plantas por lo que no contribuye a la proliferación de las mismas y a la eutrofización hasta que sea degradado. El proceso de degradación sin embargo requiere oxígeno, por lo que altos niveles de NTK reducirán el nivel de oxígeno disuelto en agua y favorecería la multiplicación bacteriana (BCME, 1998; ACUMAR, 2011).

- Nitritos

Los nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) provienen de la oxidación del amonio en condiciones aeróbicas. Esta especie es poco estable químicamente, por lo que su presencia en un agua suele indicar una contaminación fecal reciente (Martínez- Espejo, 2010; Marín Galvin, 2003).

- Nitratos

El nitrato proviene de la oxidación completa de compuestos nitrogenados y es la forma más estable del nitrógeno en los cuerpos de agua. Los nitratos son la fuente primaria del nitrógeno utilizado por las plantas, por lo que su presencia contribuye a la proliferación del fitoplancton y macrófitas, y a una posible eutrofización (BCME, 1998).

## Sulfuros

Los sulfuros son compuestos formados por azufre y un elemento químico o radical. El más importante es el sulfuro de hidrógeno, el cual es un gas altamente tóxico con olor a huevo podrido. Proviene de la descomposición anaeróbica de compuestos azufrados aunque también es un subproducto de algunos procesos industriales. En solución acuosa se convierte en ácido sulfúrico, acidificando el agua (ACUMAR, 2011; Marín Galvin, 2003).

## Fósforo total

Este parámetro mide tanto el fósforo orgánico como inorgánico. En general, el fósforo es el nutriente limitante para el crecimiento de las plantas en los cuerpos de agua dulce (Zhou *et al.*, 2009), por lo que concentraciones excesivas se asocian a la proliferación de algas y a la eutrofización de las aguas (BCME, 1998).

### **1.2.2. Ensayos de toxicidad**

La ecotoxicología es una disciplina que estudia el efecto que causa un agente tóxico o nocivo sobre los ecosistemas (Rivas, 2001). El efecto de este tóxico dependerá de: las características de la sustancia y del medio que la rodea; de la sensibilidad del organismo, población o ecosistema; y de la dosis a la cual son expuestos.

Existen diferentes métodos de estudios ecotoxicológicos y la diferencia principal entre los diferentes enfoques es la cantidad de variables y el nivel de abstracción de los ensayos. Se pueden distinguir dos metodologías principales: los estudios *in situ* y los estudios en laboratorio.

Los estudios ecotoxicológicos *in situ* son muy representativos, pero cuentan con las desventajas de estar influenciado por muchas variables, por lo que es difícil establecer una relación causa- efecto entre la exposición a un tóxico y el efecto en el organismo, resultando en su mayoría en estudios descriptivos (Boudou, 1997). Otras limitaciones son: la dificultad para predecir cambios en sistemas biológicos (Segner, 2010), y la reducción de los estudios en tiempo y lugar (períodos y sitios de muestreo) debido a la complejidad que esta metodología conlleva.

Los **ensayos monoespecíficos de laboratorio** son la metodología contraria a los estudios *in situ* en cuanto a complejidad y relevancia (Clements, 2010). Esta metodología busca la mayor reducción posible de las variables, tanto ambientales, como biológicas. Para ello en general se procede a exponer organismos de la misma especie, buscando la menor variabilidad genética posible, a un compuesto o mezcla de compuestos bajo condiciones ambientales controladas, para luego establecer una relación entre la exposición de un organismo a un compuesto y una respuesta cuantificable del mismo.

Las ventajas de este enfoque metodológico son su simplicidad y replicabilidad, su capacidad de explicar mecanismos ecotoxicológicos, y de fundamentar normativas que regulen las concentraciones de diferentes sustancias o efluentes en el ambiente. Por otra parte, su gran desventaja es la limitada capacidad de extrapolar los resultados de estos ensayos a nivel ecosistémico (Olguín, 2004), esto se debe a diversos factores no considerados en los ensayos, como por ejemplo: las diferentes sensibilidades inter e intraespecíficas; el contacto indirecto de los organismos con los tóxicos mediante otros organismos en los ecosistemas, por ejemplo por

bioacumulación; efectos crónicos, en el caso de ensayos de corta duración, y efectos en los organismos que no son visibles en la variable cuantificada del ensayo (Preston, 2002).

#### **1.2.2.1. Conceptos importantes en ecotoxicología**

- Tóxico: Cualquier agente químico o físico capaz de producir un efecto adverso para la salud (Repetto, 1995).
- Ensayos crónicos y agudos: Cuando la duración de la exposición es relativamente larga, transcurriendo en una porción significativa de la vida del organismo >10% se dice que el ensayo es crónico. Cuando la exposición ocurre en un período de vida corto (minutos, horas o días) en relación con el período de vida del organismo se dice que la exposición es aguda (Castillo, 2004).
- Concentración efectiva: Proporción de una sustancia en un medio que causa un determinado efecto en un sistema dado. En toxicología se puede hablar de  $CE_{50}$  que es la concentración que causa el efecto en el 50% de los organismos (Repetto, 1995).
- Punto final: medida o valor que expresa el resultado de un ensayo (Castillo, 2004).
- Relación dosis- respuesta: Relación entre la concentración de la exposición y la magnitud del cambio biológico resultante que usualmente se grafica en ejes cartesianos, a este gráfico se lo llama curva dosis- respuesta (Repetto, 1995).
- Control: Aquello que se utiliza como referencia o testigo en las determinaciones cualitativas y cuantitativas, para detectar interferencias o errores analíticos (Castillo, 2004).
  - Control positivo: Produce una respuesta tóxica determinada mediante la utilización de un tóxico de referencia.
  - Control negativo: Es un es un tratamiento en una investigación que duplica todos los factores que puedan afectar el resultado, excepto la condición que está siendo investigada. En ensayos de toxicidad, es aquel tratamiento que no es expuesto a las sustancias bajo estudio y se lo denomina blanco de la muestra.
- Réplica, duplicado: Dos o más unidades a ensayar bajo las mismas condiciones con fines analíticos o comparativos (Repetto, 1995).

### **1.3. Antecedentes**

En el Arroyo Cañuelas se han realizado con anterioridad ensayos toxicológicos en el marco del convenio “Evaluación de la sensibilidad de diferentes especies acuáticas, presentes en la Cuenca Matanza Riachuelo, expuestas a diversos contaminantes determinados en la misma” (UNLP, 2015), realizado entre la ACUMAR y el Centro de Investigaciones del Medio Ambiente del Departamento de Química de la Universidad de la Plata. Durante este convenio se realizó un monitoreo de los peces presentes en la cuenca, ensayos toxicológicos con muestras ambientales y ensayos toxicológicos con compuestos puros.

Para los ensayos de toxicidad con muestras de agua se tomaron como punto de muestreo las 38 estaciones de monitoreo definidas por ACUMAR, algunos de estos puntos sin embargo no se pudieron monitorear porque las estaciones no estaban activas o eran inaccesibles. Los ensayos con aguas superficiales se realizaron en cuatro campañas: primavera de 2012 (4/12/12), verano de 2012 (1/2/12) y 2 campañas en otro e invierno del 2013. Las primeras dos campañas fueron realizadas junto con el monitoreo periódico de ACUMAR de aguas superficiales, por lo que fue posible conocer las características físico-químicas de las muestras de agua utilizadas para los ensayos.

En los ensayos se utilizaron 5 organismos:

- *Hydra plagiodesmica*: Un celenterado (animal relativamente simple y exclusivamente acuático) comúnmente encontrado en cursos de agua poco corrientes en la cuenca alta.
- *Hyalella curvispina*: Un crustáceo muy abundante en los cursos de agua vegetados de la cuenca alta.
- *Daphnia magna*: Un crustáceo denominado vulgarmente “pulga de agua”. Su uso en ensayos de toxicidad es muy común. Otras especies de su mismo género (*Daphnia sp.*) son frecuentes en la cuenca alta.
- *Cnestorodon decemmaculatus*: Un pez autóctono y el más frecuentemente encontrado durante los muestreos realizados en la cuenca media y alta.
- *Lactuca sativa*: Un vegetal conocido vulgarmente como lechuga y ampliamente utilizado en ensayos de toxicidad. Este organismo fue utilizado tanto en el citado informe como en el presente trabajo, pero las condiciones de los ensayos fueron ligeramente diferentes, por lo que los resultados no son totalmente comparables.

La metodología de este trabajo fue la exposición de los organismos, bajo condiciones controladas y de acuerdo a diferentes protocolos, a muestras sin diluciones. Las diluciones de las muestras sólo se realizaron cuando se detectó toxicidad en la muestra. En este caso se procedió a diluir la muestra para calcular la LOEC (concentración más baja a la cual se observan efectos adversos).

A continuación se presentan los resultados del informe de los puntos Caño 0, Caño 1 y Caño 2. Estos puntos son coincidentes con los puntos utilizados en este trabajo, a excepción de Caño 205, el cual no pertenece a la red de monitoreo de ACUMAR.

**Tabla 1.3.1:**Resultados de ensayos de toxicidad, verano 2012.

Punto de monitoreo	Resultado de los ensayos				
	% de mortalidad <i>H. plagiodesmica</i> (celenterado)	% de mortalidad <i>H. curvispina</i> (crustáceo)	% de mortalidad <i>D. magna</i> (crustáceo)	% de mortalidad <i>C. decemmaculatus</i> (pez)	Germinación y elongación de <i>L. sativa</i> (vegetal)
Caño 0	0	0	40	0	Inhibición en la elongación de la raíz
Caño1	0	0	3,3	0	Inhibición en la elongación de la raíz
Caño2	0	0	10	0	Exaltación en la elongación de la raíz

**Tabla 1.3.2.:**Resultados de los ensayos fisicoquímicos, verano 2012.

Punto de monitoreo	OD (mg/L)	DBO <sub>5</sub> (mg/L)	DQO (mg/L)	pH (upH)	Temp. (°C)	CE (μS/cm)	NTK (mg/L)	N-NO <sub>3</sub> (mg/L)	PT (mg/L)
Caño 0	6	7	51,8	8,3	23	2760	5,4	<0,29	1,9
Caño1	7,9	7	43,4	8,41	27,2	4980	2,2	<0,29	0,53
Caño2	3,5	9	62,5	7,43	24,5	994	7,9	0,32	2,8

En los ensayos realizados en verano (Figura 1.3.1.) se encontró que sólo dos de los organismos ensayados fueron sensibles a las muestras. La muestra más tóxica para *D. magna* fue A. Caño, seguida de Caño 2 y luego Caño 1. Los ensayos fisicoquímicos no muestran grandes diferencias entre los resultados fisicoquímicos de estos dos grupos de muestras (Figura 1.3.2.).

En cuanto al ensayo realizado con *L. sativa* Caño 2 tuvo un comportamiento diferente a las otras dos muestras. La exaltación en la elongación se debe aparentemente a una mayor concentración de fosforo y nitratos en la muestra, a pesar de encontrarse una menor concentración de oxígeno disuelto. El efecto adverso en las otras dos muestras no puede ser explicado mediante los resultados fisicoquímicos. La alta conductividad de Caño 1 puede indicar una mayor concentración de compuestos disueltos, alguno de los cuales podría estar causando la toxicidad de las muestras, estos compuestos podrían seguir presentes aguas abajo en Caño 0.

**Tabla 1.3.3.: Resultados de ensayos de toxicidad, primavera 2012.**

Punto de monitoreo	Resultado de los ensayos				
	% de mortalidad <i>H. plagiodesmica</i> (celenterado)	% de mortalidad <i>H. curvispina</i> (crustáceo)	% de mortalidad <i>D. magna</i> (crustáceo)	% de mortalidad <i>C. decemmaculatus</i> (pez)	LOEC <i>L. sativa</i> (vegetal)
Cañu 0	100	Sin datos	0	0	100
Cañu1	100	Sin datos	100	100	50
Cañu2	0	Sin datos	43	0	100

**Tabla 1.3.4.: Resultados de los ensayos fisicoquímicos, primavera 2012.**

Punto de monitoreo	OD (mg/L)	DBO <sub>5</sub> (mg/L)	DQO (mg/L)	pH (upH)	Temp. (°C)	CE (μS/cm)	NTK (mg/L)	N-NO <sub>3</sub> (mg/L)	PT (mg/L)
Cañu 0	3,1	7	45,3	7,96	25,2	2070	3,8	0,66	0,92
Cañu1	0,1	111	198	8,28	27,9	2910	25	<0,29	0,54
Cañu2	10,2	<5	25,6	8,19	26,5	1034	1,4	1,1	0,31

En el muestro de primavera se observa que la muestra Cañu1 fue toxica para todos los organismos ensayados (Figura 1.3.3.). Esta característica sólo se observó en otro punto (Arroyo Cebey) de los 38 puntos analizados en el informe.

Con respecto al monitoreo anterior, la muestra de Cañu 1 fue la más toxica. Este cambio en la toxicidad estuvo acompañado de fuertes cambios en los valores físico-químicos (Figura 1.3.4.): disminución del oxígeno disuelto y la conductividad eléctrica, y aumento de la DBO<sub>5</sub>, DQO y nitrógeno total de Kjeldahl. Esto puede ser indicio de una descarga de efluentes orgánicos.

Las muestras Cañu y Cañu 2 produjeron efectos adversos sobre *L. sativa* sólo cuando la muestra no estaba diluida, esto difiere del comportamiento de Cañu 2 en el ensayo de verano. Ambas muestras mantuvieron a grandes rasgos sus características fisicoquímicas.

**Tabla 1.3.5.:** Resultados de ensayos de toxicidad, otoño 2013.

Punto de monitoreo	Resultado de los ensayos				
	% de mortalidad <i>H. plagiodesmica</i> (celenterado)	% de mortalidad <i>H. curvispina</i> (crustáceo)	% de mortalidad <i>D. magna</i> (crustáceo)	% de mortalidad <i>C. decemmaculatus</i> (pez)	LOEC <i>L. sativa</i> (vegetal)
Cañu 0	100	63,33	0	0	50
Cañu1	100	6,67	0	0	50
Cañu2	<12,5	0	0	0	0

**Tabla 1.3.6.:** Resultados de ensayos toxicológicos, invierno 2013.

Punto de monitoreo	Resultado de los ensayos				
	% de mortalidad <i>H. plagiodesmica</i> (celenterado)	% de mortalidad <i>H. curvispina</i> (crustáceo)	% de mortalidad <i>D. magna</i> (crustáceo)	% de mortalidad <i>C. decemmaculatus</i> (pez)	LOEC <i>L. sativa</i> (vegetal)
Cañu 0	0	3.3	0	0	12,5
Cañu1	100	100	100	100	25
Cañu2	0	30	0	0	12,5

En el monitoreo de invierno sólo las muestras provenientes de Cañu 1 y otro punto de monitoreo (Arroyo Cebej) dieron resultados positivos con todas las muestras estudiadas (Figura 1.3.6.). Esta situación también fue encontrada en el monitoreo de primavera del 2012 (Figura 1.3.3.).

Todas las muestras analizadas en los cuatro puntos de monitoreo presentaron toxicidad para al menos una de las especies ensayadas. Según el informe, estos resultados dan cuenta del alto grado de degradación que presenta la cuenca respecto de su capacidad para sostener una comunidad biológica.

Es de destacar que en todos los ensayos realizados, *L. sativa* mostró sensibilidad frente a las muestras, excepto Cañu 2 en el muestreo de otoño, mientras que la sensibilidad de los otros organismos fue variando. Esto refuerza la elección de este organismo para los ensayos de toxicidad del presente trabajo.

## 2. METODOLOGÍA

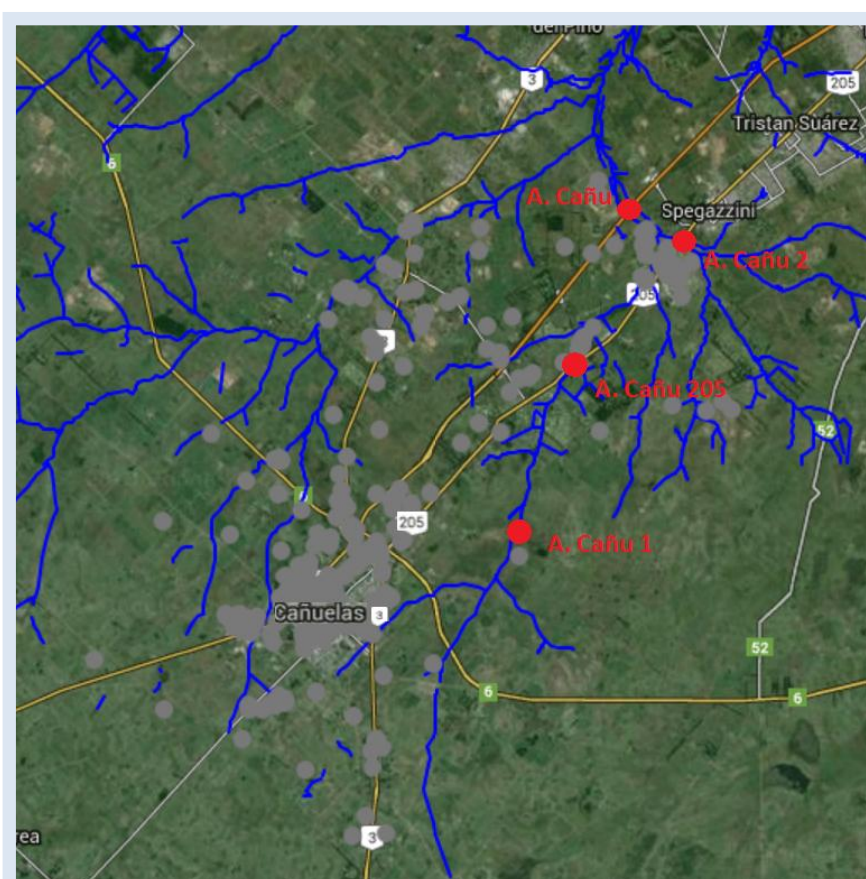
### 2.1. Muestreo

#### 2.1.1. Sitios de muestreo

La ubicación de los puntos de toma de muestras se determinó teniendo en cuenta monitoreos anteriores de otros organismos con el fin de tener una base de datos histórica de la calidad del agua. Se seleccionaron los puntos de monitoreo de ACUMAR “ArroCanu1” y “ArroCanu” sobre el arroyo Cañuelas; y el punto “ArroCanu2” sobre el arroyo Navarrete para analizar la influencia de este sobre el Arroyo Cañuelas. El cuarto punto seleccionado fue “A. Cañu 205”, para poder hacer un mejor seguimiento de la dinámica de los contaminantes sobre el Arroyo Cañuelas. Este punto ha sido incluido en monitoreos de la ACUMAR y la Municipalidad de Cañuelas.


Los muestreos se realizaron en los meses de noviembre (16/11/15), diciembre (29/12/15) y febrero (5/2/16). El monitoreo del mes de noviembre fue realizado por ACUMAR, quién facilitó las muestras para su ecotoxicológico. En este monitoreo el punto Cañu 205 no fue muestreado, por lo que en total se analizaron 11 muestras: 3 correspondientes al mes de noviembre y 4 tanto en el mes de diciembre como en febrero.

Figura 2.1.1.1: Detalle de la ubicación de los puntos de monitoreo.

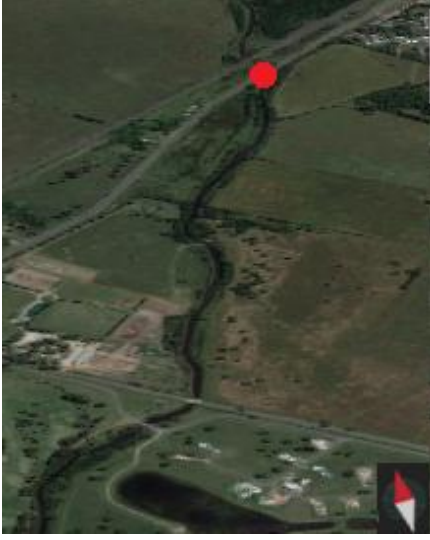


Referencias: Azul: Cursos de agua, Gris: Industrias, Rojo: Puntos de monitoreo. Fuente: Elaboración propia, Google y ACUMAR.

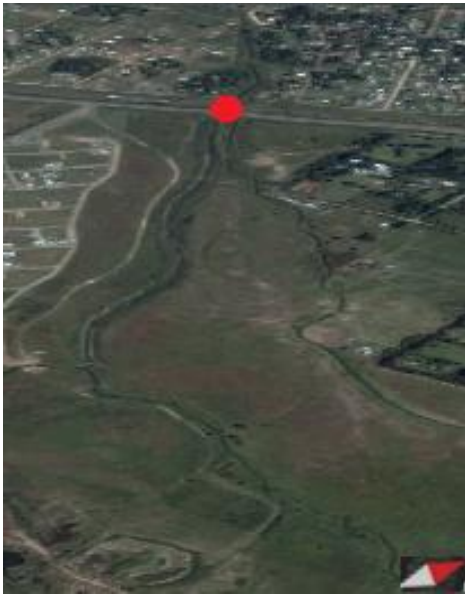
A continuación se detallan las características de los sitios de monitoreo (Ver Anexo 1):

Nombre del Sitio		<b>A. Cañuelas 1 (Cañu 1)</b>	
Coordenadas	35° 1' 23,412" S, 58° 40' 43,37" O		
Descripción	Punto en estancia. Perteneciente a los puntos de monitoreo de ACUMAR.		
Entorno	Este punto de muestreo se encuentra en un ambiente rural, donde sólo una porción del área circundante se encontraba sembrada. El río en este punto se encuentra rectificadado, y tiene un cauce moderadamente ancho. En la vegetación ribereña se observó un predominio de las herbáceas con algunos árboles dispersos en sus márgenes. En ambos monitoreos se encontró en el sitio gran cantidad de moscas y olor fétido.		

Fuente: Google maps.

Nombre del Sitio		<b>A. Cañuelas 205 (Cañu 205)</b>	
Coordenadas	34° 58' 5,117" S, 58° 39' 24,793" O.		
Descripción	Intersección del Arroyo Cañuelas con la ruta nacional 205. No pertenece a la red de monitoreo de ACUMAR.		
Entorno	Este punto de monitoreo está ubicado en una zona suburbana, rodeado de terrenos no cultivados y rodeando a algunos barrios pequeños. Los márgenes del río tienen una vegetación abundante con bosques en galería.		

Fuente: Google maps.

Nombre del Sitio	<b>A. Cañuelas 2 (Cañu 2)</b>	
Coordenadas	34° 55' 30,75"S, 58° 36' 37,354"O	
Descripción	Intersección del Arroyo Navarrete con la Ruta Nacional 205, aguas arriba del Arroyo Cañuelas. Perteneciente a los puntos de monitoreo de ACUMAR.	
Entorno	Este punto se encuentra en una zona urbanizada, río abajo se observa un asentamiento informal incipiente. Los márgenes se encuentran cubiertos por herbáceas de baja altura, posiblemente por una poda periódica. Río arriba los márgenes tampoco tienen una vegetación abundante como si ocurre en el Arroyo Cañuelas. En ambos monitoreos el arroyo estuvo cubierto por una abundante vegetación acuática emergente.	
		
	Fuente: Google maps.	

Nombre del Sitio	<b>A. Cañuelas (Cañu 0)</b>	
Coordenadas	34° 54' 54,9"S, 58° 37' 56,6"O	
Descripción	Río debajo de la confluencia del A. Navarrete con el A. Cañuelas. Perteneciente a los puntos de monitoreo de ACUMAR.	
Entorno	Este punto está ubicado en una zona rural pero con barrios y asentamientos emplazados río arriba. Los márgenes tienen un gran desnivel, con una vegetación predominantemente herbácea. El cauce en este punto era ancho y poco profundo.	
		
	Fuente: Google maps.	

## 2.2. Análisis fisicoquímicos

Los ensayos fisicoquímicos del presente trabajo se realizaron mediante ensayos de laboratorio en el Centro de Tecnologías del Uso del Agua, del Instituto Nacional del Agua de Argentina. En otros casos los parámetros se midieron *in situ* utilizando una zona multiparamétrica. Los análisis de laboratorio se realizaron siguiendo los lineamientos del *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (SM), publicado por The American Public Health Association (APHA), The American Water Works Association (AWWA), Y The Water Environment Federation. Otras técnicas fueron realizadas según normas del Instituto Argentino de Normalización y Certificación (IRAM) y los métodos incluidos en *Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical and Chemical Methods* elaborado por la Environmental Protection Agency (EPA) de Estados Unidos. La tabla contigua indica la fuente utilizada para cada técnica y su correspondiente código. Al menos que se indique lo contrario las técnicas usadas del SM provienen de la 13° edición.

**Tabla 2.2.1: Métodos de cuantificación de los parámetros físico-químicos.**

Parámetros medidos in Situ	
Parámetros	Técnica
Oxígeno disuelto	Utilización de una sonda multiparamétrica marca HANNA modelo HI 9828, siguiendo las normas IRAM 29012-2 y 29012-3.
Conductividad	
pH	
Temperatura	
Potencial de óxido reducción	
Parámetros medidos en laboratorio	
Parámetros	Técnica
DBO	SM 5210 BOD <sup>-</sup> y SM 4500-C Azide modification.
DQO	SM 5220 .
Nitrógeno total	SM 4500-NH <sub>3</sub> B y 4500-Norg 20° Edición 1998. SM132 Nesslerization method 13° Edición 1971.
Nitrógeno total de Kjeldahl	SM 4500- NH <sub>3</sub> B 20° Edition 1998, SM 4500 – N <sub>org</sub> , SM 4500-N <sub>org</sub> B 20° Edition 1998 y SM 132 B Nesslerization Method 13° Edition 1971.
Nitrógeno amoniacal	SM 4500 B NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> 132 B.
Nitratos	EPA SW 846. Método: 9200 A.
Nitritos	SM 4500 NO <sub>2</sub> <sup>2-</sup> B.
Fósforo total	SM 4500 PC.
Sulfuros	SM 4500 S <sup>2-</sup> D.

## 2.3. Ensayos de toxicidad

Para la caracterización toxicológica de las muestras de agua del Arroyo Cañuelas, se realizaron 3 tipos de ensayos estandarizados. Los criterios para la elección de los ensayos fueron: bajo costo, fácil implementación, estandarización y uso frecuente de los métodos en el ámbito académico. Las especies se seleccionaron por su sensibilidad ante diferentes contaminantes dado que una suposición básica en las evaluaciones de riesgo ecológico es que, las respuestas de las especies sensibles son extrapolables al resto del ecosistema (Whitford *et al.*, 2003) (de Paiva Magalhães *et al.*, 2014).

Los ensayos se realizaron con especies de 3 niveles tróficos distintos: *Lactuca sativa* (lechuga criolla), *Caenorhabditis elegans* (nematodo) y *Pseudokirchneriella subcapitata* (alga verde). Al conjunto de ensayos de toxicidad que utilizan organismos de diferentes niveles tróficos, se lo denomina “batería de bioensayos”. El enfoque de trabajo con baterías de bioensayos mejora la validez de la caracterización toxicológica y aumenta la capacidad de extrapolación de los resultados obtenidos a nivel ecosistémico (Bohórquez Echeverry, 2007).

Las muestras para los ensayos ecotoxicológicos se tomaron en botellas de plástico en forma simultánea con las muestras para los ensayos fisicoquímicos. Las muestras fueron analizadas dentro de las 48 horas. Sin embargo, en ocasiones fue necesario congelarlas según lo sugerido en (Czys *et al.*, 1991) (Ramirez, 2007) (Secretaría de economía Mexicana, 2008) como procedimiento válido de preservación ya que no se emplean métodos de preservación químicos (Castillo, 2004).

### 2.3.1. *Lactuca sativa*

La lechuga (*Lactuca sativa*) es una planta vascular cuyas semillas son unas de las más frecuentemente usadas en ensayos ecotoxicológicos de germinación (González Pérez, 2012). En este ensayo, que consta de cultivar las semillas de *L. sativa* en filtros humedecidos con una alícuota de la muestra, permite observar el efecto de la muestra en la germinación y desarrollo de las plántulas durante sus primeros días de crecimiento. Al analizar el desarrollo de la plántula se pueden observar efectos subletales, que no serían observados en un ensayo exclusivo de germinación. Estos efectos pueden evidenciar tóxicos presentes en concentraciones tan pequeñas que no afectan el proceso de germinación pero si afectan la elongación del tallo o raíz de la plántula (Solano Padilla, 2007).

Es importante resaltar que durante este período de germinación y primeros días de desarrollo, la plántula es muy sensible a los factores externos adversos, como sustancias tóxicas, dado que en ella están ocurriendo numerosos procesos fisiológicos de los cuales depende su supervivencia y desarrollo (Castillo Morales, 2004).

Figura 2.3.1.1: Crecimiento de *L. sativa*.



Foto izq.: Plántulas de *L. sativa* luego de ser medidas, presentan un crecimiento normal. Foto der.: Organismos expuestos a muestras ambientales con diferentes tipos de crecimiento anormal: falta de germinación, ausencia de radícula o inhibición de la elongación de la radícula.

El uso de *L. sativa* en ensayos de toxicidad ha sido avalado por diferentes organizaciones (OECD, 1984; US EPA, 1989). Las razones por las cuales ha sido sugerida para ensayos de toxicidad son que: las semillas de *L. sativa* son fáciles de conseguir, su análisis ecotoxicológico es simple y económico de realizar, no requiere de equipamiento sofisticado ni personal especializado, y utiliza pequeños volúmenes de muestra en comparación con otros ensayos. Además, no es necesario hacer un pretratamiento de los compuestos o muestras a analizar, lo que permite mantener la integridad de las muestras. Un pretratamiento común en ensayos de toxicidad consta del agregado de nutrientes específicos para evitar falsos resultados positivos por falta de nutrientes. Otros ensayos, como aquellos que utilizan peces, algas o daphnidos, no pueden realizarse con bajas concentraciones de oxígeno disuelto, o muestras turbias o coloreadas, por lo que las muestras son aireadas o filtradas respectivamente alterando significativamente las características de las muestras a analizar (ASTM, 1991).

Otra ventaja de este ensayo con *L. sativa* es que los resultados pueden ser representativos en gran medida de las semillas o plántulas en general, y por lo tanto extrapolables a la vegetación ribereña. Esta vegetación cumple diversos servicios ecosistémicos: provee de hábitat a otras especies como algas y animales, alimento para invertebrados y vertebrados, y sitios de ovoposición de invertebrados y peces. Además las plantas mantienen el funcionamiento físico y químico de los ecosistemas dulceacuícolas incrementando la claridad del agua por la reducción de sedimento en suspensión, absorbiendo nutrientes y compitiendo con las algas por la luz. Intervienen en la conversión solar de energía, de dióxido de carbono en materia orgánica, el ciclado y retención de nutrientes y la estabilización de los sedimentos (Menone, 2015).

El uso de *L. sativa* también resulta ventajoso frente al uso de otras plantas ya que su fisiología sencilla evidencia rápidamente las alteraciones en el desarrollo. En los primeros días de crecimiento, la plántula posee una radícula no ramificada que se alargará hasta formar una raíz. La radícula posee diferentes zonas: en el extremo se encuentra la cofia o piloriza con un color más oscuro que el resto y está cubierta por una cutina respondiendo a su función de abrirse paso a

través del suelo; luego sigue una zona corta llamada zona de crecimiento que se caracteriza por ser lisa y de color claro; seguido muy cercana al ápice radical, la zona de los pelos absorbentes, éstos son evaginaciones tubulosas de las células de membrana muy tenue que aumentan considerablemente la superficie de la raíz, facilitan la absorción del agua y sales minerales del suelo. La radícula luego se une al hipocotilo por medio de una sección llamada callo. Durante su desarrollo, el hipocotilo se alarga elevando las hojas embrionarias o cotiledones (González Pérez, 2012).

Se consideraron anormales las siguientes características en dichos órganos:

- Radícula e hipocotilo: manchas marrones, rojas o blancas indicadoras de necrosis, radículas retorcidas o escuálidas, escaso o nulo desarrollo de pelos absorbentes, engrosamiento de un sector de la radícula.
- Callos: Grueso, con protuberancias, fino o de difícil visualización.
- Cotiledones: Faltos de color o con gran parte de su superficie con manchas marrones.

Como punto final del ensayo se midió el largo de la radícula, que se mostró como el parámetro más sensible a la contaminación (Navarro, 2006); también se midió el largo del hipocotilo y la cantidad de semillas germinadas. Como criterio de germinación se definió la aparición visual de la radícula. Entre las germinadas se diferenció entre aquellas crecidas y no crecidas, siendo estas últimas aquellas donde el largo de su radícula o hipocotilo sea menor a 0,5 cm.

## **INSTRUMENTAL**

Estufa de laboratorio, cámara de flujo laminar.

## **MATERIALES**

- Cajas de Petri de vidrio.
- Colador de tela.
- Pinza.
- Papel de filtro de banda negra n<sup>o</sup>3.
- Regla.
- Papel film.
- Micropipeta de 1- 10 ml.

## **REACTIVOS Y MATERIAL BIOLÓGICO**

- Semillas de *Lactuca sativa* variedad Gallega cosecha de San Juan año 2012 adquiridas en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) dentro del programa FECO AGRO PRO HUERTA.

- Agua dura reconstituida (APHA, 1992 citado en (Castillo, 2004)).
- Solución de NaCl 22%.

## PROCEDIMIENTO

### Sembrado e incubación

Para el ensayo con *Lactuca sativa* se procedió a lavar las semillas con una solución de cloruro de sodio al 22% para retirar hongos que pudieran estar presentes y alteren la germinación de las semillas. Luego se enjuagaron las semillas 2 veces con agua destilada para retirar los excedentes de sal, se colaron y finalmente secaron. Posteriormente se colocó un papel de filtro en cada placa de Petri y se humedeció con 4 ml de muestra cuidando de que no queden burbujas. En los ensayos las muestras fueron analizadas por cuadruplicado y el control se realizó con Agua Dura Reconstituida. En cada placa se colocaron 15 semillas de manera aleatoria y con la mayor distancia posible para el mejor crecimiento de las plántulas. El sembrado se realizó bajo campana de flujo laminar y con placa estériles para prevenir la formación de hongos.

Una vez sembradas las placas se envolvieron en papel film para evitar la evaporación de la muestra y se expusieron a luz continua durante 24 horas a una temperatura de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  para favorecer el crecimiento de las plantas. Luego se incubaron 160 horas a  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  en oscuridad.

### Medición del punto final.

Una vez finalizado el período de incubación se procedió a observar el estado general de las plantas registrando las anomalías anteriormente descritas. Luego se las clasificaron en: no germinadas, germinadas no crecidas y crecidas según el criterio antes mencionado. Además de estas anotaciones se midió el largo de la raíz y del tallo. Los valores de germinación obtenidos se compararon con el valor promedio histórico de los blancos realizados en el laboratorio de 80%.

Para determinar diferencias significativas entre de los valores medios de las muestras y el control se realizó un análisis de la varianza con un nivel de significancia de 0,05 y un análisis *a posteriori* de comparaciones múltiples de Tukey mediante el programa InfoStat.

### 2.3.2. *Caenorhabditis elegans*

*C. elegans* es un nematodo ampliamente distribuido en todo el mundo que habita en el suelo, principalmente en aquellos ricos en microbios, o en los sedimentos presentes en el agua (Moya, 2015). Este organismo ha sido muy estudiado y ha sido utilizado frecuentemente en estudios ecotoxicológicos (Höss, 2012). Su validez como modelo biológico radica principalmente en su capacidad de predecir respuestas toxicológicas en eucariontes superiores ya que la mayoría de los procesos fisiológicos y de respuesta a estrés están conservados en organismos superiores incluyendo humanos. Otras ventajas del uso de *C. elegans* en ensayos de toxicidad son: facilidad y bajo costo para su cultivo en laboratorios, pequeño tamaño (1,5 mm de largo en adultos), corto ciclo de vida (aproximadamente 3 días) con gran número de crías por organismo (300 huevos por hermafrodita), pequeño genoma que ha sido totalmente codificado y simpleza anatómica. Otra ventaja es que, dado que el nematodo puede ser hermafrodita o macho, es posible manipular su

variabilidad genética. Otra ventaja es que su cuerpo transparente permite la clara observación de sus órganos internos mediante un microscopio (Riddle, 1997; Leung, 2008; Calvijo, 2014).

Este organismo fue elegido para la caracterización toxicológica del arroyo Cañuelas porque, además de lo anteriormente expuesto, *C. elegans* habita en el agua intersticial de los poros del suelo lo cual permite cultivarlo fácilmente en muestras de agua. El protocolo aplicado para este ensayo fue la normativa internacional ISO 10872:2010: *Water quality: Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of Caenorhabditis elegans (Nematoda)* con pequeñas modificaciones siguiendo la metodología descrita por Höss *et al.* (2013).

El ensayo se realizó en el Laboratorio de Nematología de la Cátedra de Bioquímica Aplicada de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. El mismo consistió en la incubación de nematodos en su etapa inicial de desarrollo en muestras tomadas en el Arroyo Cañuelas para luego medir el largo del nematodo como punto final.

**Figura 2.3.2.1.:** Fotografía de *C. elegans* al microscopio con aumento de 40 X.

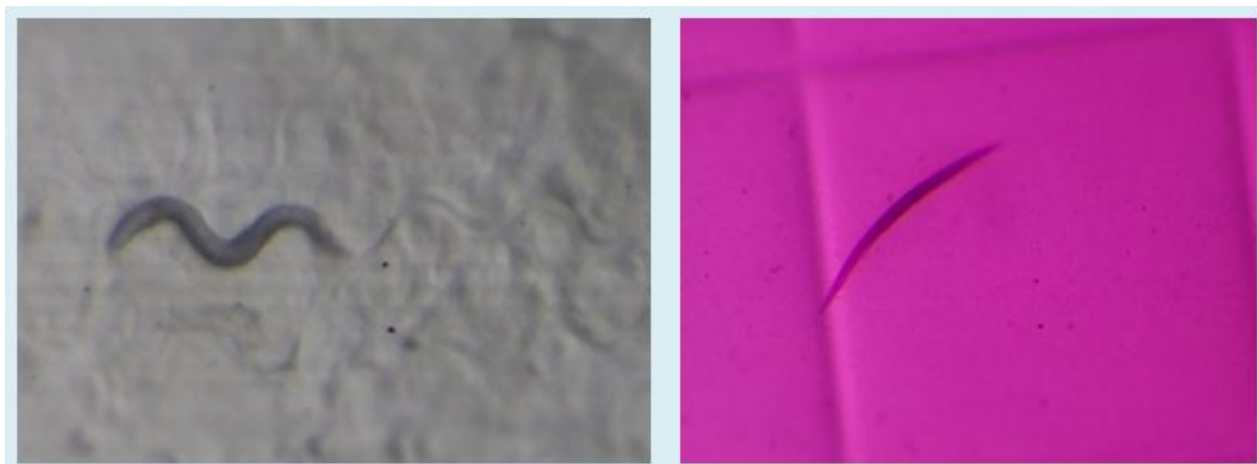


Foto izq.: *C. elegans* alimentándose del césped de *E. coli*. Fotos der. :*C. elegans* muerto y teñido con rosa de bengala. Fuente: Elaboración propia.

## **INSTRUMENTAL**

Estufa de laboratorio, heladera, calentador de bloque digital, vortex, agitador rotatorio, microscopio y lupa binocular, cámara de fotos con adaptación al microscopio, mechero.

## **MATERIALES**

- Cajas de Petri de plástico.
- Caja de Petri de plástico con cuadrícula.
- Micropipetas y tips correspondientes.
- Tubos de microcentrifuga.

- Tubos de plástico de 10 y 50 ml con tapa rosca para contener las muestras.
- Microplaca de plástico de 24 pocillos.

## REACTIVOS Y MATERIAL BIOÓGICO

- *Caenorhabditis elegans*, cepa N2 var. Bristol obtenida del Caenorhabditis Genetic Center (University of Minnesota, MN, USA).
- Cultivo de *Escherichia coli* OP50-1.
- Medio de crecimiento de nematodos (NGM) (Brenner, 1974; Lewis y Fleming, 1995).
- Solución buffer M9 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 42 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 22 mM, NaCl 85,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM).
- Solución de rosa de bengala en concentración de 5 mg/L.

## PROCEDIMIENTOS

### Obtención de los organismos para el ensayo

El cultivo de *C. elegans* fue mantenido en placas de Petri conteniendo medio de cultivo NGM cubierto por un césped bacteriano de *E. coli* a 20°C. A partir de este stock se obtuvieron los nematodos en estadio sincronizado de desarrollo L1 utilizados en los ensayos. La sincronización del crecimiento de los nematodos se realizó mediante la liberación y eclosión sincronizada de los huevos, mediante la muerte de los nematodos grávidos. La eclosión de los huevos se realizó en una solución Buffer M9 en tubos de microcentrifuga con agitación suave durante 16 horas a 20 °C.

### Exposición de *C. elegans* a las muestras de agua

Para el ensayo se colocaron en microplacas de plástico 3 ml de las muestras de agua por cada pocillo por cuadruplicado. Las muestras de agua fueron mantenidas congeladas desde el muestreo para su preservación. Estas muestras tenían un pH de entre 8 – 8.2, pero no fueron acidificadas para cumplir con el pH sugerido en la técnica de 6.5 – 7.5, dado que se priorizó no alterar las características de la muestra. Este ensayo contó con un total de 11 muestras más un control negativo de solución buffer M9.

Luego a cada pocillo se le agregó 100 µl de muestra de *E. coli* con una densidad óptica de 60 nm<sup>2</sup> para que los nematodos tuvieran alimento suficiente durante el ensayo. La muestra de *E. coli* también contenía 60 nematodos/ 100 µl. Esta muestra fue colocada con micropipeta en cada pocillo, agitando con el vortex entre cada pipeteo para mantener los nematodos en suspensión. Esta técnica permite que se coloquen en promedio 10 nematodos por pocillo.

Las microplacas fueron incubadas por 96 horas a 20°C para permitir el crecimiento y desarrollo normal de los nematodos.

### Medición del punto final

Una vez finalizado el periodo de incubación se traspasó el contenido de los pocillos a tubos de microcentrifuga para detener el crecimiento de los nematodos matándolos por calor, a una

temperatura de 60 °C. Luego los nematodos fueron coloreados con 0,25 ml de una solución de rosa de bengala para facilitar su medición ya que los mismos son transparentes. Los tubos con las muestras coloreadas fueron conservados a 4 °C hasta su tratamiento.

La medición del largo de los nematodos se realizó mediante fotografías. Para tomar las fotografías se extendió la muestra en una placa de Petri grillada que se observó al microscopio, y se tomó una foto de cada nematodo una cámara digital acoplada al microscopio. El largo de los nematodos luego fue medido con el programa ImageJ desarrollado por el *National Institute of Health* de Estados Unidos para el procesamiento científico de imágenes. En algunos casos la presencia de flóculos que adhirieron a los organismos dificultó la medición del largo de los nematodos. Los nematodos cuyos extremos no se podían apreciar con exactitud no fueron medidos

### 2.3.3. *Pseudokirchneriella subcapitata*

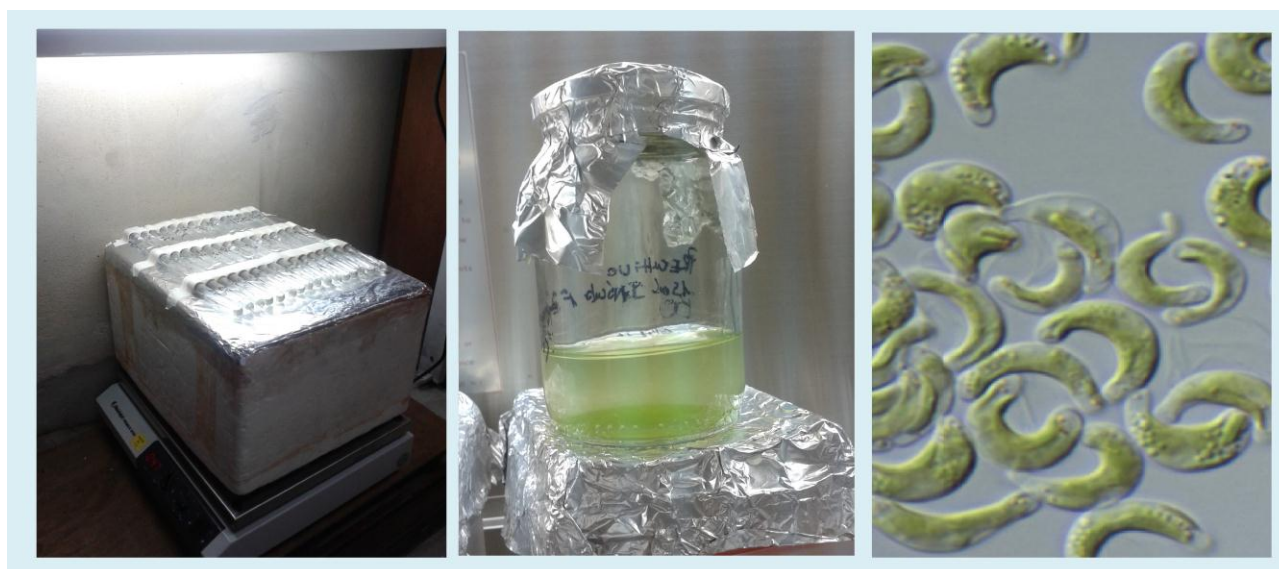
*P. subcapitata*, anteriormente llamada *Selesnatrum capricornutum* es un alga verde (clorofita) unicelular con forma de media luna que puede encontrarse en sistemas acuáticos epicontinentales (Castillo, 2004). Este organismo es actualmente el más utilizado como representante de los vegetales acuáticos que viven en cuerpos de agua dulce y es un buen representante de los productores primarios en las redes alimenticias de ambientes dulceacuícolas (Mendoza Cantú *et al.* 2013).

Una de las ventajas del uso de algas en ensayos de toxicidad es que, las algas al ser productores primarios cumplen un rol fundamental en los flujos de energía y nutrientes de los ecosistemas acuáticos (Sabater y Carrasco, 2000), y por ello un cambio en su estructura poblacional puede alterar niveles tróficos superiores. Además su característica de productores primarios las hace más sensibles a contaminantes que no tienen efecto sobre organismos heterotróficos. Un aumento excesivo de las algas, por un aumento en la concentración de nutrientes limitantes como el nitrógeno y el fósforo, puede generar anoxia, mortandad masiva de peces y/o la liberación de toxinas en caso de que proliferen ciertos tipos cianobacterias. Además, el seguimiento de las comunidades algales en diversos cuerpos de agua puede ser utilizado como indicador de procesos de enriquecimiento orgánico y eutrofización (Peña Salamanca *et al.*, 2005).

*P. subcapitata* es el alga más utilizada en ensayos de toxicidad ya que ha demostrado tener una elevada y constante sensibilidad frente a diversos tóxicos, superior a otras especies de algas y peces (Arouja, 2011). Su uso frecuente también se debe a su corto ciclo de vida, estabilidad genética, y su facilidad para cultivarse (Huarachiet *al.*, 2014), lo que le da al ensayo gran versatilidad.

El método de evaluación de la toxicidad utilizando *P. subcapitata* ha sido avalado por la ISO 8692:2012 "*Waterquality: Fresh water algal growth inhibition test with unicelular Green algae*". También ha sido avalado por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD) en su guía para el testeo de químicos número 201: "*Freshwater alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test*" y por la United States Environmental Protection Agency (EPA) en "EPA Test Method 1003.0: Green Alga, *Selesnatrum Capricornutum*, Growth Test; Chronic toxicity" (EPA, 2002).

**Figura 2.3.3.1:** Ensayo de toxicidad con *P. subcapitata*.



Izq. y centro: Cámara de incubación y precultivo de algas (Fuente: Elaboración propia). Der.: Vista al microscopio de *P. subcapitata* (Fuente: *National Institute for Environmental Studies* (Japón), *Algal Resource Database*).

## INSTRUMENTAL

Cámara de recuento de Neubauer, Espectrofotómetro, microscopio óptico, cámara de flujo laminar, mechero.

Cámara de incubación: La cámara de incubación montada para el presente trabajo tuvo una iluminación continua provista por 3 tubos de luz blanca, con una intensidad de luz medida de 480 luxes. Los cultivos se colocaron en un agitador para su agitación continua a 48 rpm. La temperatura dentro de la cámara mantuvo en  $22 \pm 2$  °C.

## MATERIALES

- Frascos de vidrio.
- Viales de centelleo de 20 ml.
- Probetas.
- Micropipetas y tips.
- Tubos de microcentrifuga.
- Gradilla.

## REACTIVOS Y MATERIAL BIOLÓGICO

- Cultivo de *P. subcapitata*.

- Agua destilada.
- Medio de cultivo para algas, preparado según (OECD, 2011).
- Solución de Iodo (0,25 g de cristales de iodo en 100 ml de etanol al 95%).

## PROCEDIMIENTOS

### Obtención de los organismos para el ensayo

Para los ensayos se realizaron precultivos de algas en fase de crecimiento a partir de cultivos mantenidos en medio sólido o líquido. De ellos se tomó un inóculo y se lo sembró en 100 ml de medio de cultivo para algas entre 3 a 5 días expuesto a luz fría continua sin necesidad de agitación mecánica. Al cabo de dicho periodo se calculó la concentración algal del precultivo utilizando una cámara de recuento de Neubauer.

### Exposición de *P. subcapitata* a las muestras a ensayar

Las muestras de agua fueron mantenidas en frío hasta el momento de ser ensayadas. Dada la cantidad de sólidos suspendidos en la muestra, se procedió a dejar decantar la muestra luego de agitarse para que al trasvasarse no sean arrastrados y no aumenten la turbiedad de las muestras (UK Environment Agency, 2008). Se prefirió este método no invasivo para eliminar la turbiedad, frente a otros métodos, para no alterar la naturaleza de la muestra. El ensayo se realizó en esterilidad para evitar una contaminación bacteriana que introduzca un error en las determinaciones de densidad óptica.

Las muestras y el agua estéril para el control se colocaron en frascos de vidrio estériles, en donde se les agregó las soluciones del medio de cultivo para algas según (OECD, 2011) para evitar falsos resultados positivos por escases de nutrientes en las muestras. Luego se agregó un inóculo del precultivo con el fin de obtener una concentración final de  $1 \times 10^5$ . Esta concentración, que es un orden de magnitud mayor a lo recomendado por las técnicas estandarizadas, se estableció por el límite de cuantificación del espectrofotómetro.

Se colocaron 6 ml de las soluciones de algas en viales de vidrio con tapa rosca según lo recomendado en (Arouja, 2011) y se colocaron en la cámara de incubación por 3 días con 2 o 3 réplicas para cada día.

### Medición del punto final

En el tiempo inicial y luego cada 24 horas se midió la absorbancia de las muestras con espectrofotómetro UV a una longitud de onda de 687 nm, pico similar al encontrado por (Riveiro Rodriguez *et al.*, 2011), con cubeta de 20 mm de paso óptico. Adicionalmente se tomó 1 ml de muestra que se preservó en tubo de microcentrifuga con dos gotas de solución de iodo para realizar los recuentos en microscopio en la cámara de Neubauer y con un aumento de 200 X.

Se graficaron tanto los valores de absorbancias como los recuentos para obtener las curvas de crecimiento de *P. subcapitata*. Durante los ensayos se encontró una absorbancia basal de las muestras a la longitud de onda medida, la cual fue restada de las muestras con algas.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Determinaciones fisicoquímicas

Para la mejor interpretación de los resultados obtenidos, se procedió a colorear las celdas de los diferentes parámetros según los niveles guía de la normativa propuesta por ACUMAR para los usos de los cuerpos de agua superficiales: Uso IV para actividades recreativas pasivas y uso V para la preservación de la vida acuática con exposición prolongada (PJM, 2009) (Tabla 3.2.1.1).

El criterio usado fue:

- **Verde:** Cumple con el uso V.
- **Amarillo:** No cumple con el uso V pero cumple con el uso IV.
- **Rojo:** No cumple con el uso IV.

Los casilleros sin colorear corresponden a parámetros no regulados por los niveles guías fijados por la ACUMAR.

##### 3.1.1. Muestreo de noviembre.

En la semana previa al monitoreo se registraron cuantiosas lluvias y altas temperaturas, siendo la temperatura del día de monitoreo aproximadamente de 29 °C (Fuente: INTA estación meteorológica Castelar). Cabe recordar que dado que el monitoreo fue realizado por la ACUMAR los parámetros fisicoquímicos medidos difieren de los siguientes muestreos de este trabajo y no se incluyen datos del punto Caño 205.

**Tabla 3.1.1.1.: Determinaciones fisicoquímicas del muestreo de noviembre.**

Parámetro	Unidades	Caño 1	Caño 0	Caño 2
CE	μS/cm	1469	1223	848
pH	upH	8,22	8,14	8,44
ORP	mV	-	-	-
Turbidez	NTU	74	15	39
OD	mg/L	5,47	4,29	8,48
Temp.	°C	26,5	23,5	24,8
DBO <sub>5</sub>	mg/L	-	-	-
DQO	mg/L	-	-	-
N <sub>total</sub>	mg/L	10	6,3	4,8
NTK	mg/L	9,8	5,1	2,3
N-NH <sub>3</sub>	mg/L	8,5	4,8	2,0
N-NO <sub>2</sub>	mg/L	0,38	0,56	1,8
N-NO <sub>3</sub>	mg/L	0,21	0,70	0,65
PT	mg/L	-	-	-

S	mg/L	<0,045	*	*
---	------	--------	---	---

\*No se pudo realizar la determinación.

En el sitio de muestreo Cañu 1 se encontró un mayor número de determinaciones por encima de los límites establecidos por el nivel guía para la protección de la vida acuática (Figura 3.1.1.1.). El sitio de muestreo en el arroyo Navarrete (Cañu 2) tuvo valores más cercanos a los niveles guía mientras que el sitio Cañu 0 presentó valores intermedios entre los dos puntos anteriores. Si bien, todas las muestras analizadas cumplen con el uso de actividades recreativas pasivas (uso IV) sólo algunos parámetros cumplen con el uso V.

En el punto de muestreo Cañu 1 la concentración de nitrógeno amoniacal (8,5 mg/L) fue superior a la establecida por los niveles guía para la conservación de la biota (<0,6 mg/L). Además de las altas concentraciones de nitrógeno encontradas (10 mg/L N<sub>total</sub>), se determinó el NTK con un valor de 9,8 mg/L lo cual sugiere que la mayor parte del nitrógeno total se hallaba en sus formas oxidadas. Las altas concentraciones de NTK serían indicativas de una contaminación orgánica reciente (chebro.es, 2016). En este punto también se encontraron valores altos de sulfuros (<0,045 mg/L), superiores a los sugeridos para el uso V del agua, lo cual puede indicar tanto la degradación anaerobia de compuestos azufrados como la descarga de efluentes industriales con sulfuros (ACUMAR, 2011). La concentración de oxígeno disuelto (5,47 mg/L) fue levemente mayor al fijado para la conservación de la vida acuática de <5 mg/L.

En Cañu 2, se encontraron valores más altos de oxígeno disuelto (8,48 mg/L) en comparación con los puntos pertenecientes a A. Cañuelas. Esta concentración de oxígeno disuelto cumple con los límites del uso V. El valor de nitrógeno total fue de 4,8 mg/L, mientras que la concentración de nitrógeno amoniacal fue de 2 mg/L, superior al límite de 0,6 mg/L establecido por el uso V. Asimismo, en este punto se encontraron valores de nitritos mayores a los encontrados en A. Cañuelas. Dada la inestabilidad de este compuesto, el mismo podría indicar contaminación fecal reciente (Capote y Lixandro, 2010) o contaminación por fertilizantes nitrogenados, en caso de encontrarse en áreas agrícolas (Ortiz, 2009). Las altas concentraciones de nitritos encontradas podrían ser tóxicas para ciertos organismos acuáticos (Rodríguez, 2001; Camaro y Alonso, 2007).

Al comparar el A. Navarrete (Cañu 2) con A. Cañuelas río arriba (Cañu 1), se observa que estos cursos de agua tienen características fisicoquímicas diferentes. Por una parte en Cañu 1 se encuentran bajas concentraciones de oxígeno (5,47 mg/L) lo cual se correlaciona con la presencia de nitrógeno mayoritariamente como amoníaco (8,5 mg/L N-NH<sub>3</sub>). Por otra parte en Cañu 2 se encuentran menores concentraciones de las especies de nitrógeno reducidas (1,8 mg/L de NO<sub>2</sub> y 0,65 mg/L de NO<sub>3</sub>), lo cual concuerda con las mayores concentraciones de OD encontradas (8,48 mg/L). La diferencia en las concentraciones y tipo de nitrógeno encontrado sugerirían diferentes fuentes de contaminación en ambos cursos de agua.

En la muestra del punto Cañu 0 se determinaron concentraciones de oxígeno disuelto y nitrógeno amoniacal que superaron los niveles guía para el uso V. La concentración medida de OD fue 4,29 mg/L, menor al límite establecido para el uso V de 5 mg/L. Por otro lado la concentración de nitrógeno amoniacal (4,8 mg/L N-NH<sub>3</sub>) superó en un 800% la concentración máxima establecida por el nivel guía de 0,6 mg/L. Cabe destacar que este parámetro fue 4,5 veces menor que en la muestra

del punto de muestreo río arriba (Caño 1) lo cual podría deberse a la degradación de los compuestos y explicaría el aumento en las concentraciones de nitratos (0,70 mg/L) río abajo.

Por otra parte es notorio que en Caño 0 se registren los valores más bajos de oxígeno disuelto en comparación con los puntos de muestreo río arriba. Esto se podría deberse a una descarga de efluentes, posiblemente por un conducto cloacal clandestino según lo encontrado por DiPSOH (2011).

### 3.1.2. Muestreo de diciembre

Durante el muestreo de diciembre, se registró una temperatura de 35,4 °C, no habiéndose registrado precipitaciones en la semana previa al mismo (Fuente: INTA).

**Tabla 3.1.2.1: Resultados fisicoquímicos, muestreo diciembre.**

Parámetro	Unidades	Caño 1	Caño 205	Caño 0	Caño 2
CE	μS/cm	2227	1363	2155	1280
pH	upH	8,28	8,11	7,97	8,24
ORP	mV	-142	-39,3	19,8	8,7
OD	%	92,8	80,7	52	137
	ppm	7,2	6,1	3,93	10,2
Temp.	°C	27,3	28,8	28,6	29,16
DBO <sub>5</sub>	mg/L	16,8	5,7	4,7	-*
DQO	mg/L	47,9	29,7	77,8	14,3
NTK	mg/L	9,36	2,99	2,96	1,91
N-NO <sub>3</sub>	mg/L	1,1	<0,09 <sup>*2</sup>	1,4	2,7
PT	mg/L	0,7	<0,2 <sup>*2</sup>	0,5	0,6

\*No se pudo calcular por interferencias en la muestra.

\*<sup>2</sup> Concentración menor al límite de detección.

**Tabla 3.1.2.2: Índice de biodegradabilidad, muestreo de diciembre.**

Muestra	Caño 1	Caño 205	Caño 0	Caño 2
DBO <sub>5</sub> / DQO	0,35	0,19	0,06	-
Tipo	Biodegradable	Poco Biodegradable	Poco Biodegradable	-

En las muestras de agua del punto Caño 1 se determinaron valores máximos de conductividad (2227 μS/cm), pH (8,28 upH), DBO<sub>5</sub> (16,8 mg/L), DQO (47,9 mg/L), NTK (9,36 mg/L) y fósforo total (0,7 mg/L). Los niveles altos de DBO<sub>5</sub> superaron escasamente el límite establecido para el uso IV (<15 mg/L), pero superaron en un 560% los límites del nivel guía para el uso V (<3 mg/L). Estos

valores de DBO<sub>5</sub>, junto con los valores negativos de ORP encontrados (-142 mV), las altas concentraciones de nutrientes (0,7 mg/L de PT y 9,36 mg/L de NTK) y el aumento de la conductividad sugerirían una fuerte contaminación orgánica en este punto. Por otro lado, se calculó el índice de biodegradabilidad (Figura 3.1.2.2.) (Martínez Soza, 2010) que permite describir la naturaleza biodegradable de la materia orgánica presente en la muestra. El valor obtenido fue de 0,35 lo cual indica la presencia de compuestos tanto biodegradables como recalcitrantes.

En el punto de muestreo Caño 205 se determinó una conductividad de 1363  $\mu$ S/cm, pH de 8,11, ORP de -39,3 mV, oxígeno disuelto de 6,1 mg/L, DBO<sub>5</sub> de 5,7 mg/L, DQO de 29,7 mg/L y NTK de 2,99 mg/L (Tabla 3.1.2.1.). El aumento del ORP junto con el descenso de los parámetros anteriormente mencionados mostraría una mejora en la calidad del agua y la degradación de los compuestos orgánicos cuantificados río arriba. Los parámetros que tuvieron un marcado descenso frente a Caño 1 fueron: DBO<sub>5</sub> (33,9%), DQO (62%) y NTK (31,9%). Contrariamente a la tendencia de los demás parámetros, el oxígeno disuelto mostró un descenso en la calidad del agua, pasando de una concentración de 7,2 a 6,1 mg/L. En cuanto al fósforo total, no se pudo determinar si estos cumplían con el nivel guía de 0,001 mg/L dado que este valor es menor al límite de detección de la técnica de 0,2 mg/L, límite que fue alcanzado por esta muestra.

El punto de muestreo Caño 2 evidenció en general valores adecuados para la conservación de la vida acuática (Uso V) siendo los valores de conductividad de 1280  $\mu$ S/cm, pH de 8,24 y oxígeno disuelto de 10,2 ppm. El parámetro que superó dicho nivel guía fue el fósforo total encontrándose en concentraciones de 0,6 mg/L siendo el nivel máximo permitido de 0,001 mg/L

En comparación con los puntos del A. Cañuelas, la muestra Caño 2 presentó valores mayores de ORP (8,7 mV) y OD (10,2 mg/L), y valores menores de DQO (14,3 mg/L) y NTK (1,91 mg/L). Esto indicaría que la calidad del agua está más cercana a los niveles guía IV y V, a excepción de los nitratos los cuales se encuentran en mayor concentración (2,7 mg/L) en comparación con A. Cañuelas.

En el punto Caño 0 se determinó con respecto a los puntos río arriba (Caño 205 y Caño 2), un aumento en la conductividad (2155 mV) cercana a los valores encontrados en Caño 1. También se determinaron valores mínimos de OD (3,93 mg/L) que no cumplieron con los niveles guía del uso IV y valores máximos de DQO (77,8 mg/L). Los cambios en estos parámetros indicarían el ingreso de un efluente antes del punto Caño 0 con una alta carga orgánica mayormente no biodegradable en virtud del índice de biodegradabilidad obtenido de 0,06 (Tabla 3.1.2.2).

### 3.1.3. Muestreo de febrero

En el caso del muestreo de febrero, se encontró en punto de monitoreo A. Caño 1 el agua presentaba una coloración blancuzca y un fuerte olor desagradable (ANEXO 1). Esto se debería posiblemente a descargas de efluentes de una industria láctea cercana al río (Comunicación Personal). También se observó que el arroyo tenía mayor caudal que en el monitoreo de diciembre.

En el punto A. Caño 2 se observó una proliferación de las macrófitas flotantes con respecto al monitoreo de noviembre que llegaban a cubrir casi todo el espejo de agua, asimismo se observaron algas en suspensión y presencia de peces pequeños.

**Tabla 3.1.3.1.: Determinaciones fisicoquímicos del muestreo de febrero.**

Parámetro	Unidades	Caño 1	Caño 205	Caño 0	Caño 2
CE	μS/cm	3547	2702	2305	1357
pH	upH	8,62	8,66	8,55	8,14
ORP	mV	-360,6	70,5	18,6	109,6
OD	%	3,2	62,9	129	113
	ppm	0,25	4,85	9,98	8,66
Temp.	°C	26,10	27,78	27,92	27,57
DBO <sub>5</sub>	mg/L	>.... <sup>*3</sup>	25,7	7,8	4,1
DQO	mg/L	550	84	43	19
NTK	mg/L	21,44	9,75	4,16	2,34
N-NO <sub>3</sub>	mg/L	ND <sup>*5</sup>	ND <sup>*5</sup>	<0,29 <sup>*4</sup>	0,54
PT	mg/L	1,2	0,6	0,5	1,0

<sup>\*3</sup> No se pudo calcular dado que el valor de DBO<sub>5</sub> superaba ampliamente el rango de medición.

<sup>\*4</sup> Concentración menor al límite de cuantificación. <sup>\*5</sup> No detectable.

**Tabla 3.1.3.2.: Índice de biodegradabilidad, muestreo de febrero.**

Muestra	Caño 1	Caño 205	Caño 0	Caño 2
DBO <sub>5</sub> / DQO	-	0,3	0,2	0,2
Tipo	-	Biodegradable	Biodegradable	Biodegradable

En el sitio de muestreo Caño 1 la conductividad medida fue de 3547 μS/cm. Este valor casi triplicó y duplicó los valores de conductividad medidos en noviembre y febrero respectivamente. Además, se midieron valores muy bajos de ORP (-360,6 mV) y de oxígeno disuelto (0,25 mg/L). Este parámetro no cumplió con el uso IV fijado por la ACUMAR y es indicativo de un ambiente tendiente a condiciones anóxicas. Otros parámetros que tuvieron una marcada variación con respecto al monitoreo anterior fueron: la DQO que aumentó en más de un orden de magnitud, el NTK que se duplicó y el PT que fue 120 veces mayor al límite establecido por el uso V. Los valores obtenidos fueron de 550 mg/L, 21,44 mg/L y 1,2 mg/L respectivamente. Por otra parte la DBO<sub>5</sub> mostró valores tan altos que superó el rango de medición de la técnica y no pudo ser cuantificada.

La caracterización fisicoquímica de la muestra indicaría que las descargas de efluentes con altas cargas orgánicas podrían ser la causa de las condiciones reductoras y pre-anóxicas halladas en el punto de muestreo Caño1.

Río abajo se observó una mejora parcial en la calidad del agua dado que se encontraron valores de ORP positivos (70,5 mV) y una mayor concentración de oxígeno disuelto (4,85 mg/L) que cumplió con el uso IV para actividades recreativas pasivas. También se determinó que la DQO (84 mg/L) y las

concentraciones de nutrientes, nitrógeno como NTK (9,75 mg/L) y fósforo total (0,6 mg/L PT), se redujeron significativamente (aproximadamente un 50% en ambos nutrientes y un 85% en la DQO). A pesar de esta mejora, tanto la DBO<sub>5</sub> (25,7 mg/L), como el OD (4,85 mg/L) y la concentración de PT (0,6 mg/L) no cumplieron con los límites del uso V para la protección de la vida acuática.

Las características del A. Navarrete fueron mucho más satisfactorias que en el arroyo Cañuelas ya que se encontraron valores máximos de ORP (109,6  $\mu$ S/cm) y concentraciones de OD (8,66  $\mu$ S/cm) mayores a 5 mg/L, que cumplen con el límite establecido para la conservación de la vida acuática (Uso V). Sin embargo, se encontraron niveles de DBO<sub>5</sub> y fósforo, levemente mayores al límite establecido para dicho uso. Según el Índice de Biodegradabilidad calculado de 0,2 (Tabla 3.1.3.2.) los compuestos presentes en la muestra se clasificarían entre biodegradables y poco biodegradables.

En el punto Caño 0 se encontraron los valores máximos de oxígeno disuelto (9,89  $\mu$ S/cm), y una calidad de agua levemente mejor que Caño 205 disminuyendo los valores de DQO (43 mg/L), DBO<sub>5</sub>(7,8 mg/L) y PT (0,5 mg/L). Estos últimos dos parámetros no cumplieron con el uso V de cuerpos de agua superficiales. Esto indica que, si bien la calidad del agua mejora a lo largo del río, en el punto Caño 0 las características del agua no serían satisfactorias para la preservación de la vida acuática con exposición prolongada.

De las determinaciones fisicoquímicas mencionadas anteriormente, se destaca un fuerte deterioro en la calidad del agua en el sitio Caño 1 lo cual también impactó aguas abajo en el punto Caño 205. Ninguno de estos dos puntos cumplió con lo establecido en el uso IV para las actividades recreativas pasivas.

#### 3.1.4. Interpretación de los resultados.

Al comparar las caracterizaciones fisicoquímicas de las muestras obtenidas en los diferentes meses, se encontró que el Arroyo Cañuelas tuvo un marcado deterioro en la calidad de sus aguas en el mes de febrero, y en menor medida en el mes de diciembre. En el muestreo de noviembre se encontró un perfil fisicoquímico más satisfactorio para el A. Cañuelas. Las lluvias registradas en los días previos a este muestreo podrían haber contribuido a una dilución de algunos contaminantes.

Tanto en febrero como en diciembre se observó que la peor de calidad de las aguas del A. Cañuelas se encontraba aguas arriba en el punto Caño 1. Dado el perfil fisicoquímico de las muestras, esto podría deberse a un vuelco periódico de efluentes mayormente orgánicos que disminuirían el oxígeno disuelto a condiciones casi anóxicas. Las altas temperaturas registradas en los días de los muestreos contribuirían aún más a la reducción del oxígeno disuelto. Por otra parte, también se observó que la contaminación en Caño 1 afectó el punto de muestreo río abajo, Caño 205. Sin embargo, se observa una mejoría en la calidad de las aguas entre estos dos puntos. Esto podría deberse a algún proceso de autodepuración del río e indicaría que no hay un ingreso significativo de contaminantes entre estos dos puntos.

El punto de muestreo del Arroyo Navarrete presentó características fisicoquímicas similares a lo largo de los tres meses estudiados. Se encontraron valores de CE de alrededor de 1000  $\mu$ S/cm, OD de alrededor de 8,2, NTK de alrededor de 2 mg/L y también se encontraron valores de DQO de alrededor de 17,5 para los meses de diciembre y febrero. Sólo los nitratos variaron notablemente

encontrándose valores de 0,6 y 0,5 mg/L en los meses de noviembre y febrero pero valores de 2,7 mg/L en el mes de diciembre.

Las características fisicoquímicas del punto Caño 0 no siguieron una tendencia clara a lo largo de los meses y con respecto a los otros puntos. En los meses de noviembre y febrero la mayoría de los parámetros fueron similares a los encontrados en los puntos río arriba, Caño 205 y 2 excepto en el mes de diciembre cuando se encontró un notorio aumento en la conductividad y la DQO con respecto a los otros dos puntos.

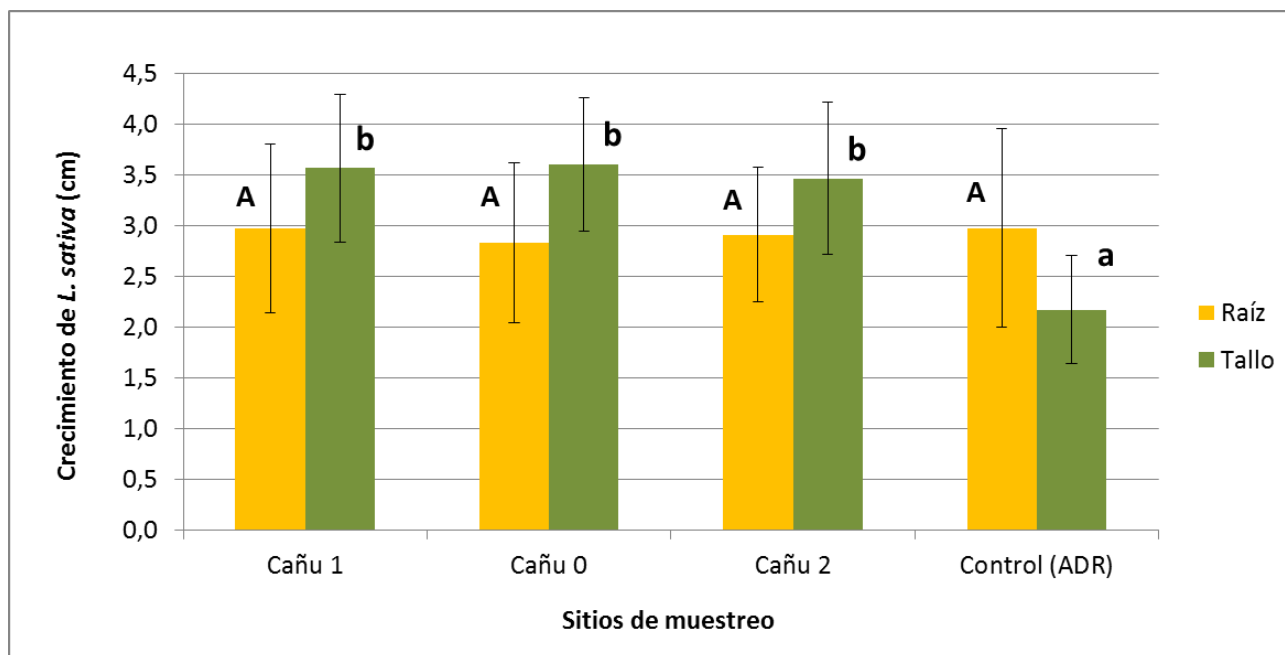
### 3.2. Resultados de ensayos con *L. sativa*.

#### 3.2.1. Muestreo de noviembre

En los ensayos realizados se encontraron diferentes respuestas entre la elongación de la raíz y del tallo (Figura 3.2.1.1). En todas las muestras el tallo fue significativamente ( $p < 0,05$ ) más largo con respecto al control, mientras que en la raíz, no hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre ningún grupo de muestras.

Las diferencias en los porcentajes de germinación en comparación con el blanco y en orden descendiente fueron: 11% en Caño 1, 12% en Caño 0, -1% en el control y -3% en Caño 2. Caño 1 fue la muestra que mayor porcentaje de germinación obtuvo, así como también la mayor elongación promedio del tallo (3,6 cm al igual que Caño 0) y una de las mayores elongaciones de raíz (3 cm al igual que el control).

Figura 3.2.1.1.: Ensayo de toxicidad con *L. Sativa* expuestas a muestras del A. Cañuelas correspondientes al muestreo de noviembre.



Los valores con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

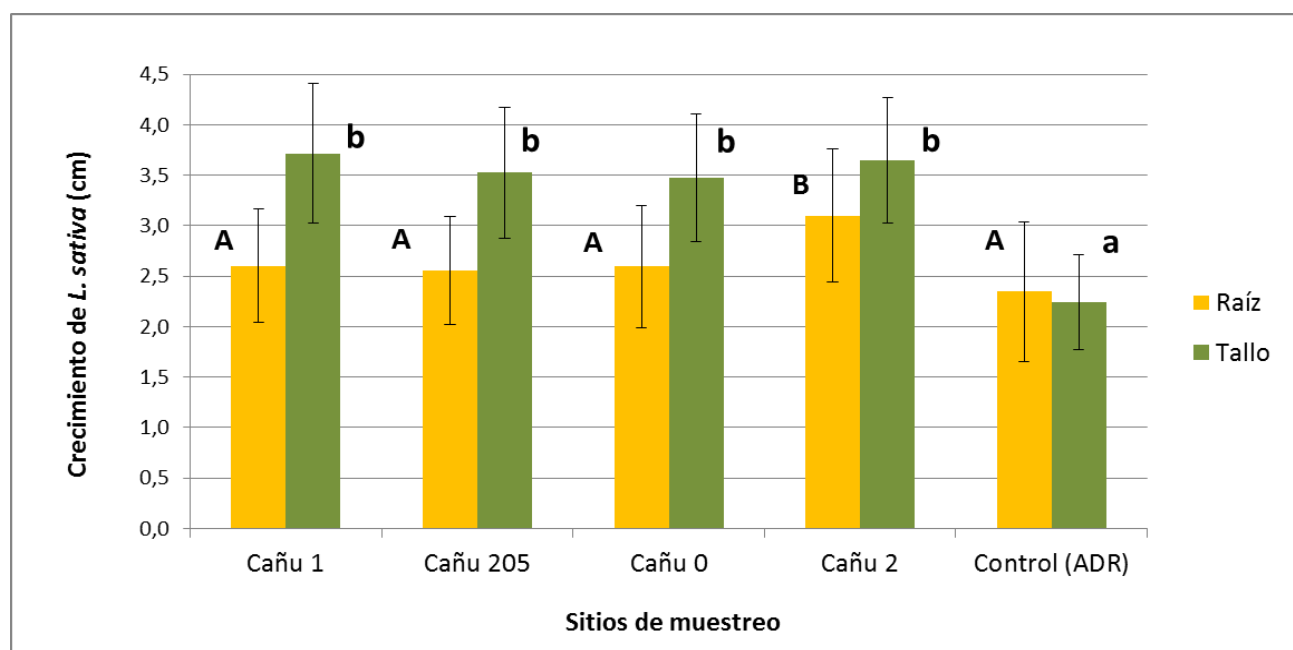
### 3.2.2. Muestreo de diciembre

En los ensayos del mes de diciembre se encontró el mismo patrón de respuestas en los tallos que en el mes de noviembre, en donde todas las muestras tuvieron una elongación significativamente mayor que el control ( $p < 0,05$ ) (Figura 3.2.2.1). El promedio de elongación del tallo en orden descendente fue: 3,7 cm en Cañu 1, 3,6 cm en Cañu 2, 3,53 cm en Cañu 205 y 3,47 cm en Cañu 0.

Se encontraron diferencias significativas en la elongación de las raíces, donde la muestra de Cañu 2 fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que las otras muestras y el control. Los promedios de elongación de la raíz en orden descendente fueron: 3,1 cm en Cañu 2, 2,6 cm en Cañu 1, Cañu 205 y Cañu 0, y 2,3 cm en el control.

Las diferencias en los porcentajes de germinación en comparación al blanco y en orden descendente fueron: 11% en Cañu 0, 7% en Cañu 205, 8% en Cañu 2 y 4% en Cañu 1.

**Figura 3.2.2.1:** Ensayo de toxicidad con *L. Sativa* expuestas a muestras del A. Cañuelas correspondientes al mes de diciembre.



Los valores con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

### 3.2.3. Mes de febrero

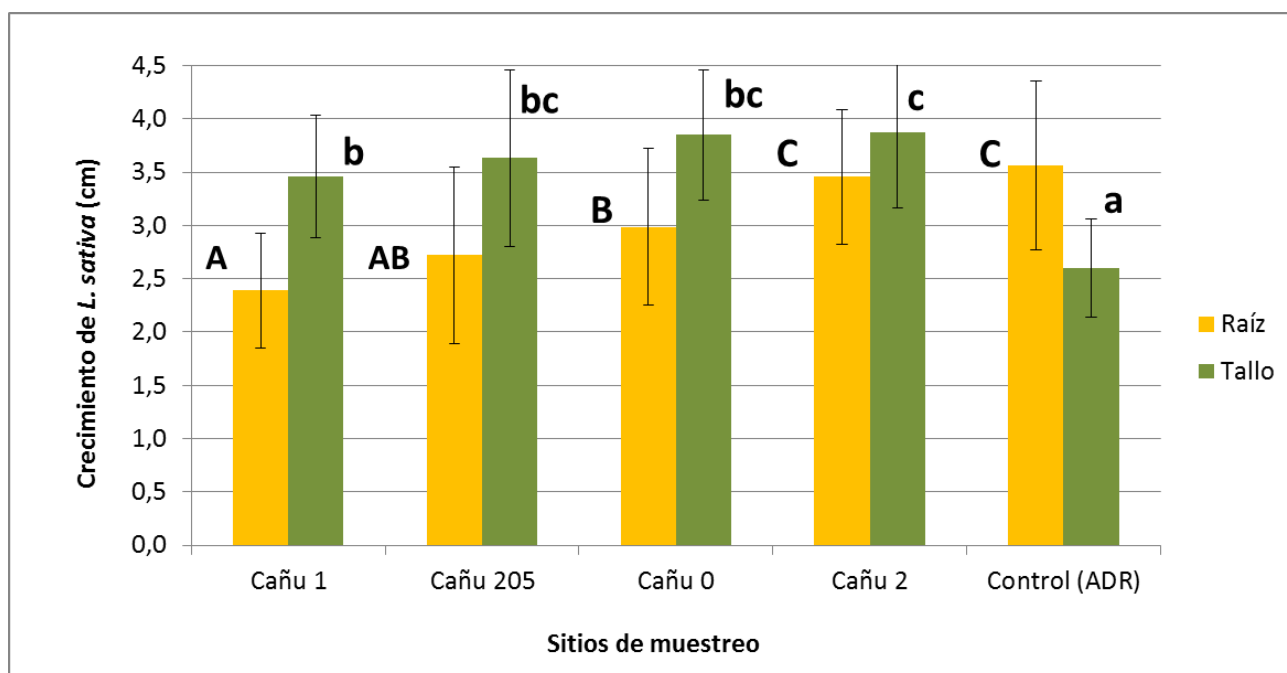
En los ensayos realizados en el mes de febrero se encontraron diferencias significativas tanto en la elongación de la raíz como en el tallo (Figura 3.2.3.1.). Con respecto a la elongación del tallo, este fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) para todas las muestras analizadas. El punto de muestreo que produjo la menor elongación promedio fue Cañu 1 (3,5 cm).

Este parámetro fue aumentando río abajo registrándose una elongación promedio del tallo de 3,6 cm en Cañu 205 y 3,8 cm en Cañu 0. En cuanto a la muestra del Arroyo Navarrete, esta produjo el mayor largo promedio de tallo (3,9 cm) siendo este valor significativamente diferente al encontrado en Cañu 1.

En cuanto al largo de las raíces se observó un patrón similar al encontrado en el tallo, en donde el parámetro aumenta siguiendo el curso del río, encontrando en Cañu 1 el menor crecimiento de la raíz. Además en Cañu 2 también se obtuvo el valor más alto en comparación con los puntos de muestreo pertenecientes al A. Cañuelas, siendo su valor promedio (3,5 cm) similar al control (3,6 cm).

Las diferencias en los porcentajes de germinación en comparación al blanco y en orden descendente fueron: 7% en Cañu 2, sin diferencias en Cañu 205 y Cañu 2 y -3% en Cañu 1. Cañu 1, que presentó el menor porcentaje de germinación, también presentó la menor elongación de tallo y raíz.

**Figura 3.2.3.1:** Ensayo de toxicidad con *L. Sativa* expuestas a muestras del A. Cañuelas tomadas el 5/2/16.



Los valores con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

### 3.2.4. Interpretación de los resultados.

En los ensayos realizados con *L. sativa* se encontró una bioestimulación significativa en la elongación del tallo en todas las muestras de todos los meses a excepción del punto Cañu 1 en el mes de febrero. La bioestimulación del crecimiento de *L. sativa* puede ser producto de una concentración abundante de nutrientes (Solano Padilla, 2007; Rodríguez Romero *et al.*, 2014), situación que se evidenció en la caracterización fisicoquímica de todas las muestras, las cuales superaron el nivel guía establecido para el uso IV de conservación de la biota en los casos en que este parámetro pudo ser cuantificado.

En cuanto a la elongación de la raíz, este parámetro fue estimulado por la muestra Cañu 2 de diciembre, y fue disminuido por las muestras de A. Cañuelas de febrero. En las otras muestras no se registraron diferencias significativas con respecto al control. Estos resultados son similares a aquellos encontrados por la UNLP (2015) dado que en ambos trabajos Cañu 2 presentó un incremento en la elongación de la raíz (Tabla 1.3.1.) posiblemente por una mayor concentración de nitratos (Tabla 1.3.2.). Además en ambos trabajos *L. sativa* tuvo un menor crecimiento (Tabla

1.3.3.) en Caño 1 asociado a una disminución en la calidad del agua determinada a partir del marcado aumento en los valores de DBO<sub>5</sub>, DQO, NTK y conductividad eléctrica y en la disminución en el oxígeno disuelto (Tabla 1.3.2.).

### 3.3. Resultado de ensayos con *C. elegans*

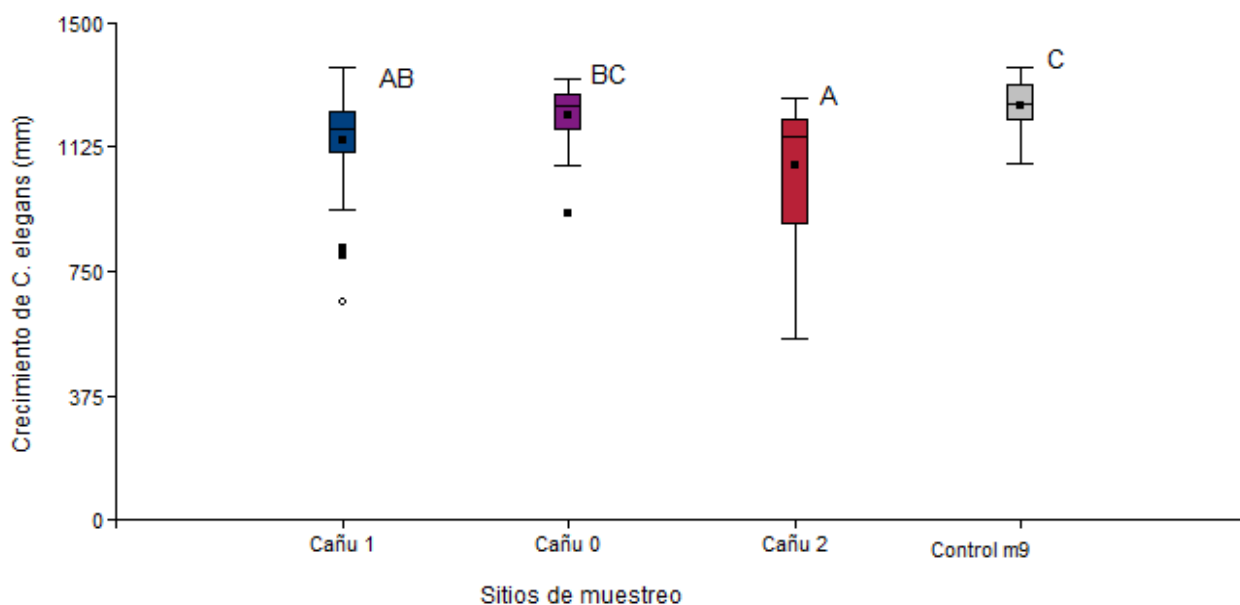
Las muestras de todos los meses y puntos de muestreo se analizaron en conjunto. Sin embargo, los resultados de los ensayos se separarán por mes de muestreo para la mejor comprensión de los mismos.

#### 3.3.1. Muestreo de noviembre.

El grupo de nematodos con mayor crecimiento fue el correspondiente al control (M9), con un crecimiento medio de 1249 mm. El siguiente grupo con mayor crecimiento fue Caño 0 con una media de 1221 mm, seguido de Caño 1 con una media de 1142 mm. La muestra que presentó un menor crecimiento medio fue Caño 2 con una media de 1070 mm.

Mediante un Análisis de Varianza se determinó que el crecimiento de *C. elegans* se redujo significativamente ( $p < 0,0001$ ) al ser expuesto a Caño 1 y Caño 2 indicando un efecto tóxico marcado de las muestras de agua sobre el desarrollo de *C. elegans*.

**Figura 3.3.1.1.:** Resultados del ensayo de toxicidad con *C. elegans* expuestas a muestras del Arroyo Cañuelas correspondientes al monitoreo de noviembre.



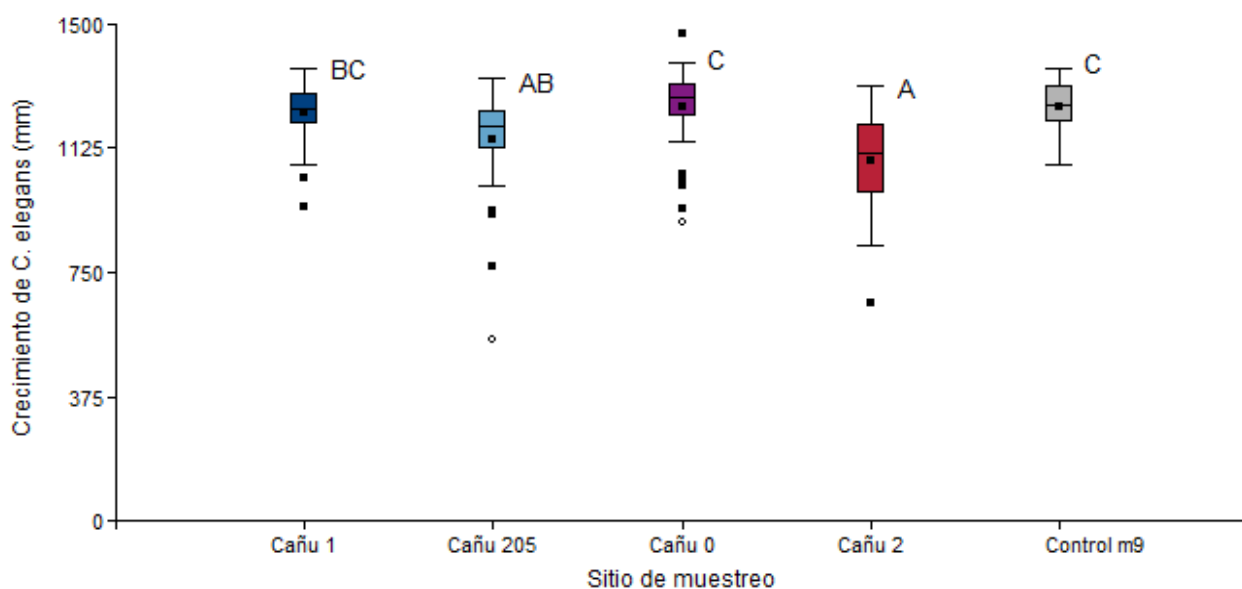
Los valores con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

### 3.3.2. Muestreode diciembre

La muestra que produjo el mayor crecimiento de *C. elegans* fue Caño 0 en donde la elongación media del nematodo fue de 1251 mm. Las muestras que produjeron el mayor crecimiento, ordenadas en forma descendente fueron: el control con 1249 mm, Caño 1 con 1233 mm, Caño 205 con 1153mm y por último Caño 2 con 1088 mm.

El análisis estadístico mostró que no se hallaron valores significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) en el crecimiento de *C. elegans* entre las muestras de Caño 0, Caño 1 y el control, indicando que ninguna de las muestras presentó toxicidad para *C. elegans* (Figura 3.3.2.1). Las muestras en las que se evidenció un crecimiento significativamente menor al control fueron Caño 1 y Caño 2.

**Figura 3.3.2.1:** Resultados del ensayo de toxicidad con *C. elegans* expuestas muestras del Arroyo Cañuelas correspondientes al monitoreo de diciembre.



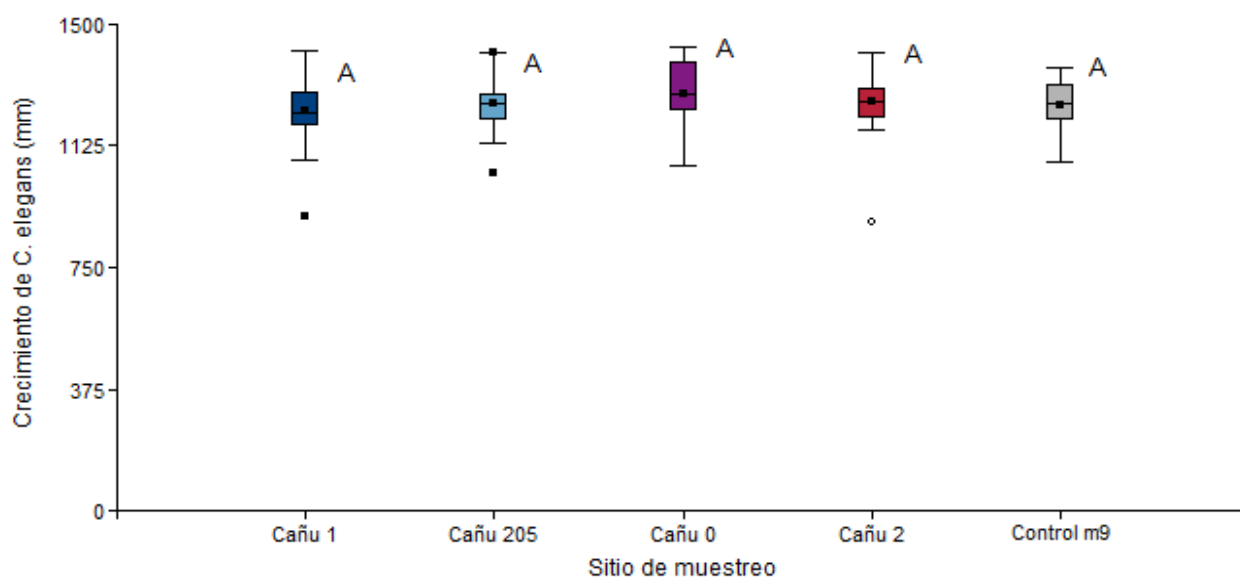
Los valores con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

### 3.3.3. Muestreode febrero

Todos los ensayos realizados con las muestras de agua extraídas en febrero presentaron crecimientos similares sin diferencias significativas entre ellas y con el control ( $p > 0,05$ ). El largo promedio de *C. elegans* en el control fue de 1251 mm, mientras que el crecimiento en las muestras en orden decreciente fue: Caño 0 con 1286 mm, Caño 2 con 1263 mm, Caño 205 con 1256 mm y por último Caño 1 con 1230 mm.

Dado los resultados de los ensayos realizados se sugiere la ausencia de toxicidad para este grupo de muestras. Sin embargo, cabe resaltar que en las muestras de agua de Caño 1 y de Caño 2 se encontraron valores atípicos bajos.

**Figura 3.3.3.1.:** Resultados del ensayo de toxicidad con *C. elegans* expuestas a muestras del Arroyo Cañuelas correspondientes al monitoreo de febrero.



Los valores con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

#### 3.3.4. Interpretación de los resultados.

En los ensayos realizados con *C. elegans* se detectó toxicidad en algunos puntos de muestreo, pero estas respuestas no fueron iguales a lo largo de los meses.

En el monitoreo de noviembre no se encontraron características tóxicas para las muestras provenientes de Caño 0. Sin embargo, las muestras en Caño 1 y 2 fueron tóxicas para *C. elegans*, lo cual indicaría la presencia de contaminantes río arriba y la recuperación del cuerpo de agua río abajo.

En el monitoreo de diciembre se obtuvieron resultados similares a los encontrados en noviembre en cuanto Caño 2 fue la muestra que mayor toxicidad presentó y Caño 0 fue la muestra en donde se produjo el mayor crecimiento de *C. elegans*. También se destaca que Caño 205 presentó mayor toxicidad que Caño 1, lo cual indicaría el ingreso de contaminantes entre estos puntos del Arroyo.

En el monitoreo de febrero también se encontró que la muestra Caño 0 tuvo el mayor crecimiento para *C. elegans*, indicando la mejora de la calidad del agua río abajo. Por otra parte, si bien la muestra Caño 1 presentó un menor crecimiento frente al control, esta disminución no fue significativa pese a la baja calidad de sus aguas y los bajos niveles de oxígeno disuelto encontrados (Tabla 3.1.3.1.).

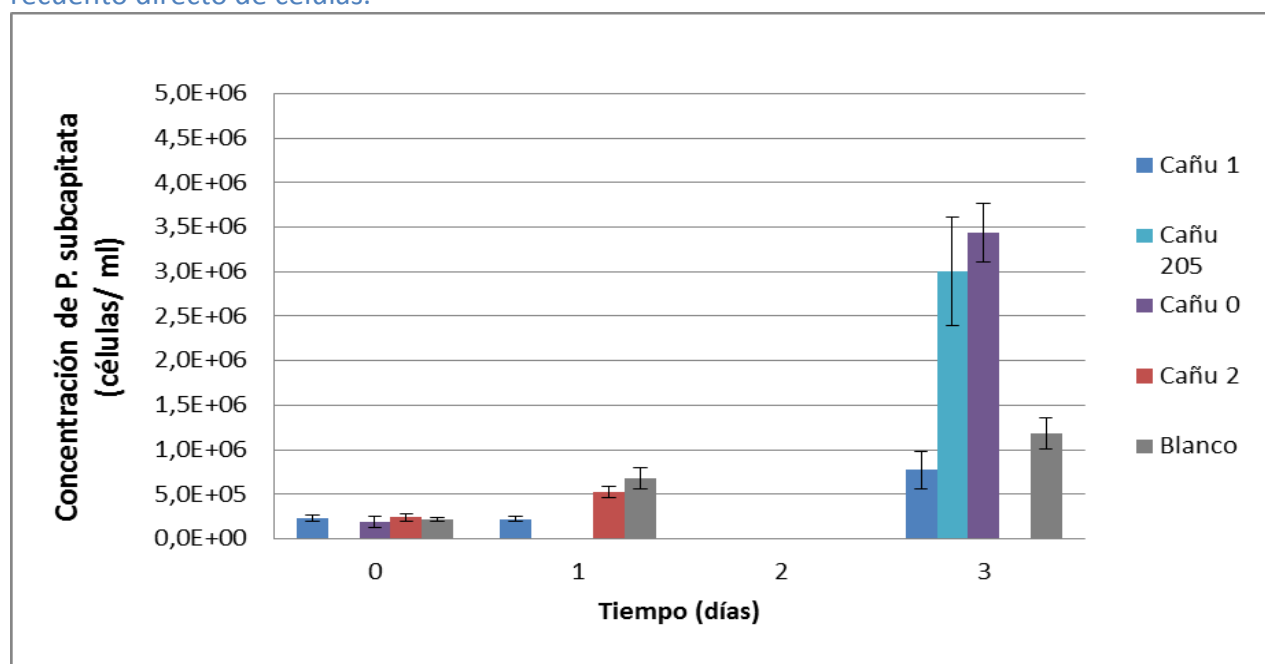
### 3.4. Resultado de los ensayos con *P. subcapitata*

#### 3.4.1. Muestreo de diciembre

Se realizaron dos ensayos con las muestras correspondientes al muestreo de diciembre. El primer ensayo se realizó con las muestras que se mantuvieron congeladas desde el día del muestreo hasta el día del ensayo. Se logró medir el crecimiento de las algas sólo mediante la absorbancia, ya que las muestras presentaron al microscopio partículas semicirculares que no pudieron ser identificadas e interferían en el recuento directo.

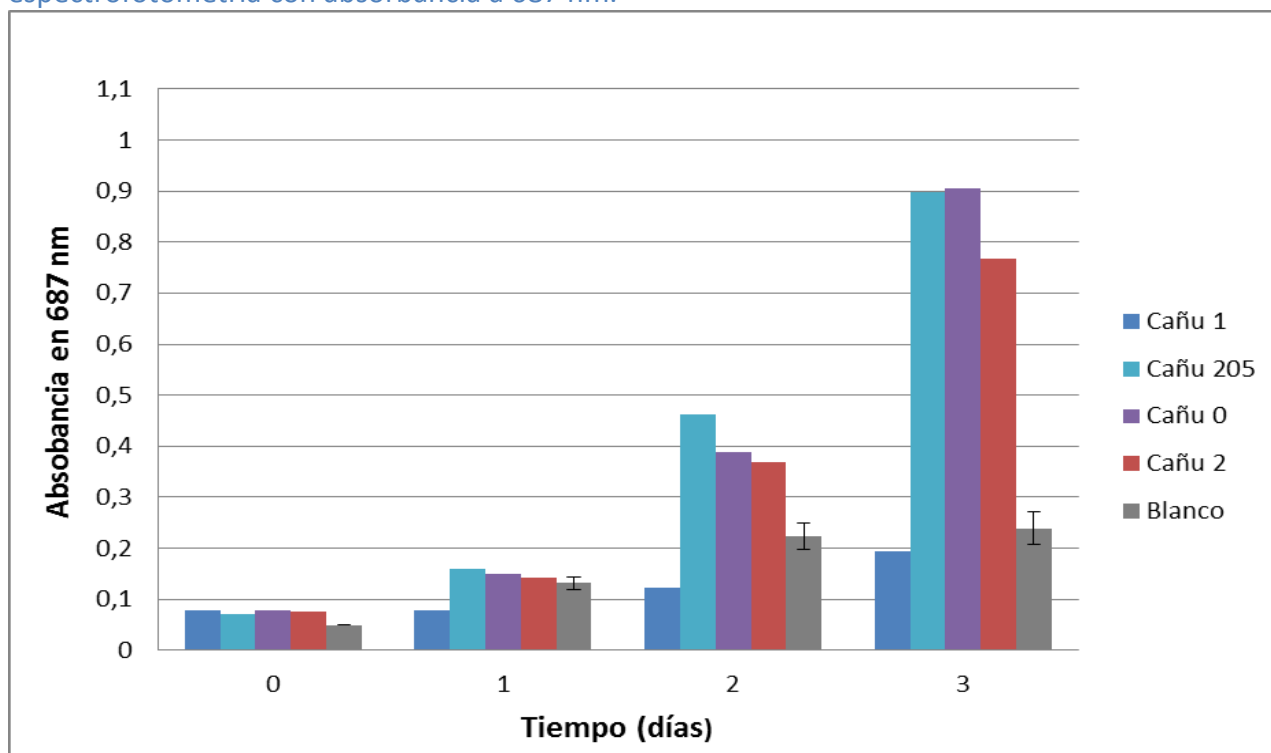
En el primer ensayo del mes de diciembre se realizaron controles por duplicados, los cuales se presentan en la figura 3.4.1.2 como un único valor promediado.

**Figura 3.4.1.1.:** Ensayo de toxicidad con *P. subcapitata* expuestas a muestras congeladas del Arroyo Cañuelas correspondientes al monitoreo diciembre. Determinación del crecimiento algal por recuento directo de células.



En las figuras 3.4.1.2. y 3.4.1.1. se observa que *P. subcapitata* tuvo un crecimiento menor al ser expuesta a Caño 1 en comparación con el blanco (inhibición del 35% calculado mediante recuento directo y del 19% mediante espectrofotometría). Por otra parte, la tasa de crecimiento de *P. subcapitata* aumentó considerablemente frente a Caño 205, y Caño 0 en un 275% y 278% respecto del control para ambos casos. Asimismo y en menor medida se incrementó en un 221% en Caño 2. Cabe destacar que *P. subcapitata* tuvo un comportamiento notoriamente diferente entre Caño 1 y Caño 205, siendo estos dos puntos contiguos sobre el Arroyo Cañuelas.

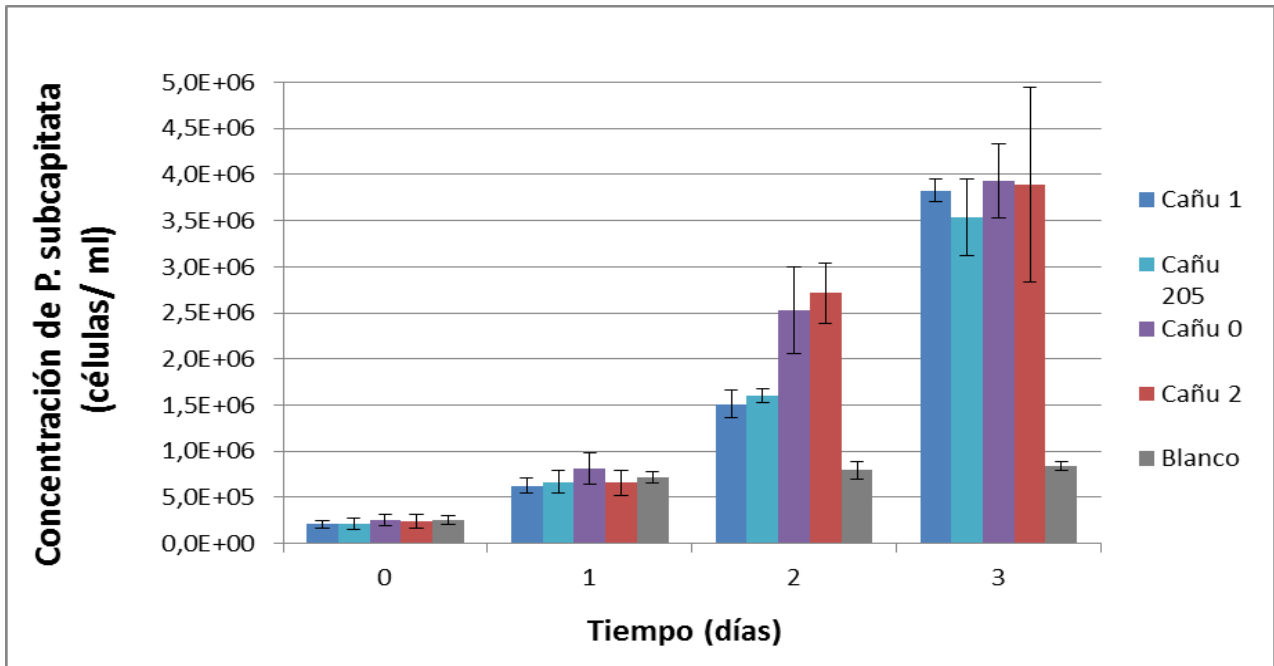
**Figura 3.4.1.2.:** Ensayo de toxicidad con *P. subcapitata* expuestas a muestras congeladas del Arroyo Cañuelas correspondientes al monitoreo diciembre. Determinación del crecimiento algal por espectrofotometría con absorbancia a 687 nm.



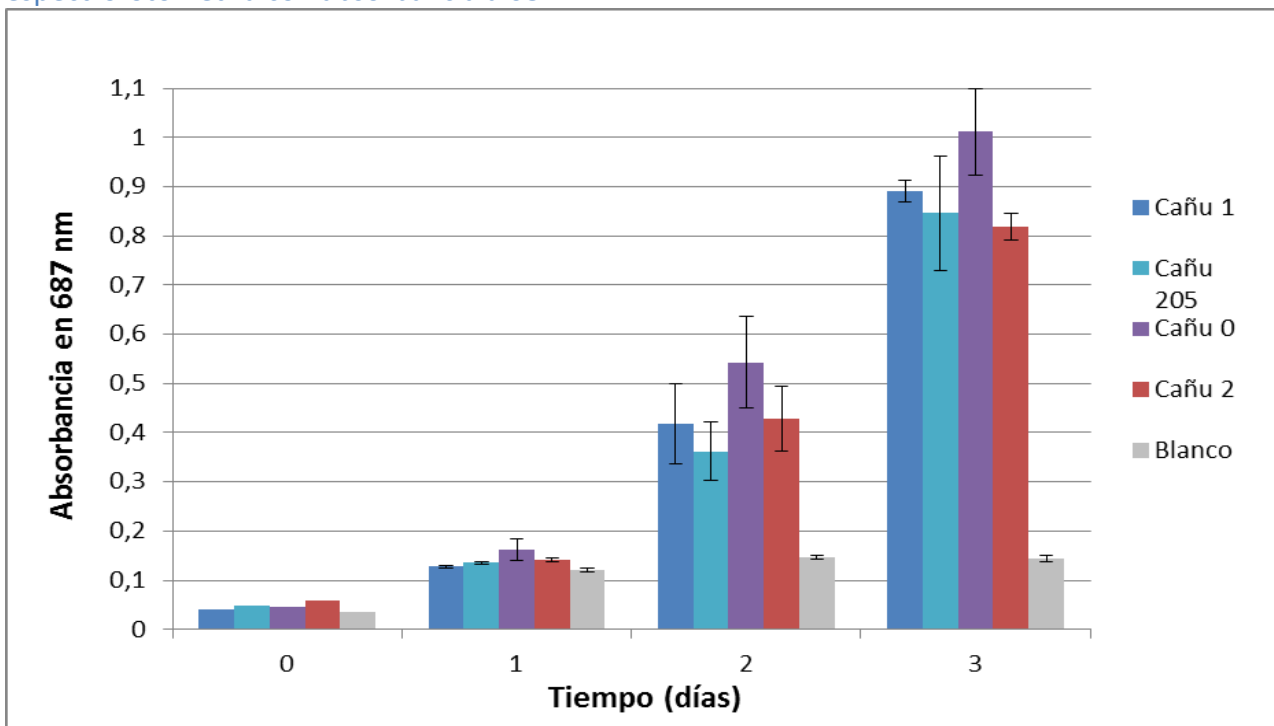
Dados los problemas con las muestras anteriormente descritos, se volvió a realizar un ensayo con muestras del mes de diciembre que se conservaron en refrigeración a  $4 \pm 2$  °C. El ensayo mostró un comportamiento similar de *P. subcapitata* en todas las muestras en comparación con el ensayo anterior, a excepción de Caño 1 (Figura 3.4.1.3.).

Esta muestra provocó un crecimiento menor al blanco cuando fue preservada en congelación, siendo las concentraciones finales del ensayo  $7,7 \times 10^5$  cel/ml y  $1,1 \times 10^6$  cel/ml en Caño 1 y en el blanco respectivamente. Sin embargo, la muestra preservada en refrigeración tuvo un comportamiento diferente, obteniendo una concentración final de *P. subcapitata* en Caño 1 ( $3,8 \times 10^6$  cel/ml) mucho mayor al control ( $8,4 \times 10^5$  cel/ml) y a pesar de que la concentración inicial de todas las muestras de ambos ensayos fue de  $2,2 \times 10^5 \pm 0,1$  cel/ml. Una posible explicación para el comportamiento de esta muestra es que la materia orgánica de la muestra fue preservada mediante la congelación y limitó la biodisponibilidad de los nutrientes al actuar como un ligando.

**Figura 3.4.1.3.:** Ensayo de toxicidad con *P. subcapitata* expuestas a muestras refrigeradas del Arroyo Cañuelas correspondientes al monitoreo diciembre. Determinación del crecimiento algal por recuento directo de células.



**Figura 3.4.1.4:** Ensayo de toxicidad con *P. subcapitata* expuestas a muestras refrigeradas del Arroyo Cañuelas correspondientes al monitoreo diciembre. Determinación del crecimiento algal por espectrofotometría con absorbancia a 687 nm.



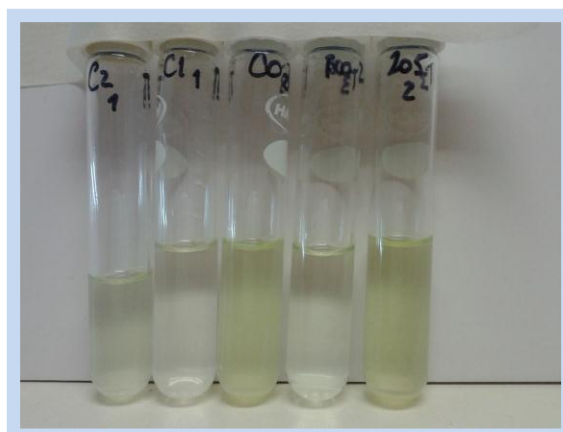
Dado que las diversas fuentes de información recomiendan la congelación como método de preservación de las muestras, se tomarán como válidos los resultados del primer ensayo.

### 3.4.2. Muestreo de febrero

Los ensayos del mes de febrero mostraron que las tasas de crecimiento de todas las muestras difirieron significativamente ( $p > 0,05$ ) entre sí y con respecto al blanco cuando fueron cuantificadas por recuento directo (Figuras 3.4.2.2.).

La muestra Caño 1 tuvo una concentración algal promedio al comienzo del ensayo de  $1,75 \times 10^5$  cel/ml. mientras que al finalizar el período de incubación el recuento fue de  $2,14 \times 10^5$  cel/ml. Si se comparan las concentraciones iniciales y finales del ensayo se observa que casi no hubo crecimiento (Figura 3.4.2.2) (Figura 3.4.2.1.). El crecimiento pobre de *P. subcapitata* expuesta a Caño 1 se evidenció en la forma hinchada de las células que en ocasiones llegaron a romperse. El gran volumen de las células pudo deberse a la presencia de metales pesados en especial cadmio y zinc tal como fue observado en trabajos previos (Machado, 2013) u otras sustancias que generen presión osmótica sobre las células.

**Figura 3.4.2.1:** Diferencias en el crecimiento de *P. subcapitata* frente a diferentes muestras ambientales al concluir el ensayo de toxicidad.



Tubos de cultivo de *P. subcapitata* expuestas a las muestras del arroyo Cañuelas en el tercer día de incubación. De izq. A der.: Caño 2, Caño 1, Caño 0, Blanco y Caño 205.

La muestra Caño 205 al finalizar el ensayo tuvo una concentración un 40% menor a la del Blanco medida mediante recuento directo (Figura 3.6.1.2.). En las curvas de crecimiento calculadas mediante absorbancia (Figura 3.6.1.3.) se encontraron resultados similares si se considera el desvío estándar de la muestra Caño 205. Estos resultados aportan una caracterización de la muestra como levemente tóxica, pero con un nivel mucho menor que su punto de monitoreo río arriba (Caño 1).

Por otra parte, los puntos de monitoreo Caño 0 y Caño 2 presentaron una curva de crecimiento mucho mayor que el blanco (Figura 3.6.1.2). Al finalizar el ensayo se encontró que la concentración con respecto al blanco, medida por recuento directo, fue 4 veces más alta en Caño 2 y 1,6 veces en Caño 0.

Figura 3.4.2.2.: Ensayo de toxicidad con *P. subcapitata* expuestas a muestras del Arroyo Cañuelas correspondientes al monitoreo febrero. Determinación del crecimiento algal por recuento directo de células.

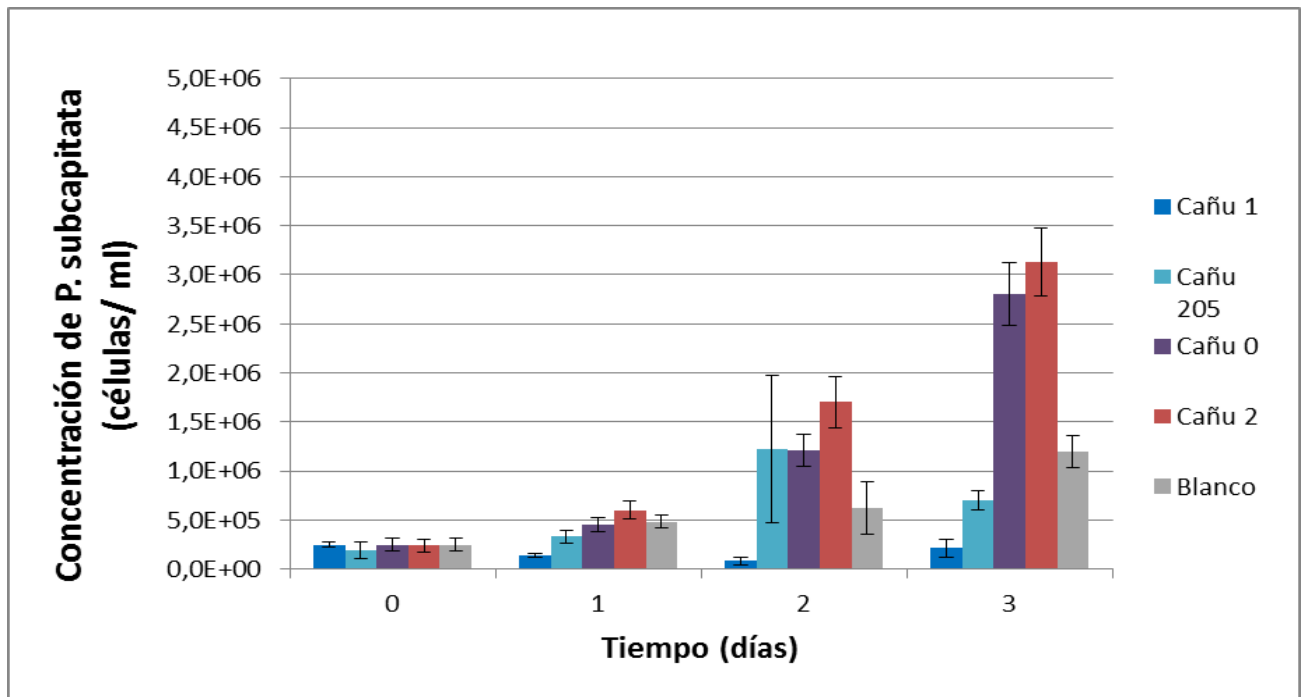
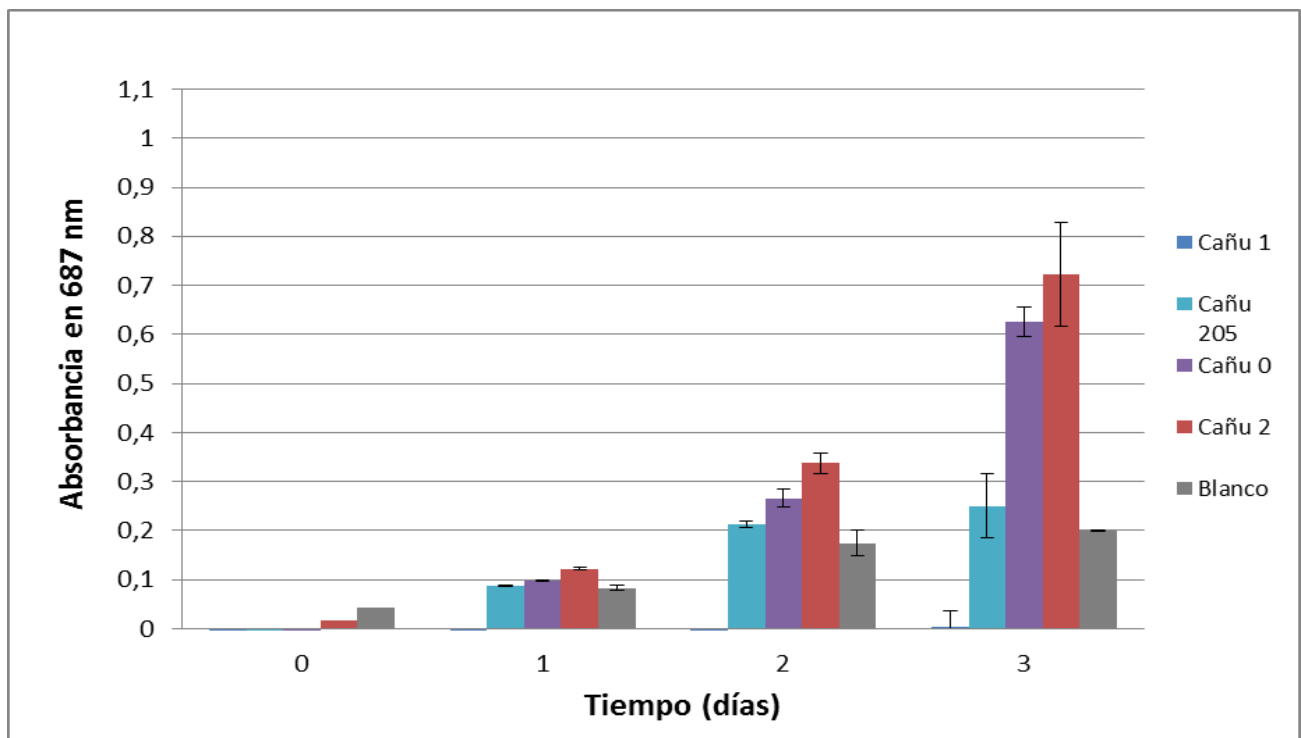


Figura 3.4.2.3.: Ensayo de toxicidad con *P. subcapitata* expuestas a muestras del Arroyo Cañuelas correspondientes al monitoreo febrero. Determinación del crecimiento algal por espectrofotometría con absorbancia a 687 nm.



### 3.4.3. Interpretación de los resultados

En los ensayos realizados con *P. subcapitata* se encontró una bioestimulación del crecimiento en los puntos Caño 2 y Caño 0, esto podría deberse a un exceso de nutrientes en ambos puntos (Källqvist, 1984) que se manifestó en las altas concentraciones de DBO<sub>5</sub> y fósforo total encontradas. Otro estudio (Olguín Salinas, 2004) encontró el mismo efecto utilizando otras especies de algas en cursos de agua con un perfil fisicoquímico similar.

Por el contrario, en las muestras obtenidas en los puntos Caño 1 y Caño 205 el crecimiento de *P. subcapitata* fue significativamente menor, indicando características tóxicas de las muestras para *P. subcapitata*. Esta toxicidad podría deberse a la formación de especies amoniacales en un ambiente casi anóxico (Tabla 3.1.3.1.), las cuales son tóxicas para las algas en concentraciones altas (Abelovich y Azov, 1975; Azov y Goldman, 1981; Pittman *et al.*, 2011; AST Ingeniería *et al.*, 2013). La disminución del oxígeno disuelto también podría producir otros compuestos potencialmente tóxicos como el sulfuro de hidrógeno (Camaro y Alonso, 2007).

## 3.5. Análisis conjunto de los resultados

Con el fin de resumir e interpretar más fácilmente la gran cantidad de información obtenida en el presente trabajo, se procedió a asignar colores a los resultados obtenidos y sintetizarlos en una tabla. Los criterios para los colores fueron:

En el caso de los ensayos fisicoquímicos se siguió con los criterios expresados en el punto 3.1. Se adjudicó a cada muestra el color del parámetro que más se alejó de los niveles guía.

Los casilleros en gris representan parámetros para los cuales no se tienen datos.

Para los ensayos con *L. sativa* se asignó:

- Verde: Si no hubo diferencias significativas con respecto al control en la elongación del tallo o en la raíz, tanto en exaltación como en reducción de los largos.
- Amarillo: Hubo diferencias significativas en uno de los dos parámetros mencionados.
- Rojo: Hubo diferencias significativas en ambos parámetros medidos.

Para los ensayos con *C.elegans* se asignó:

- Verde: No hubo diferencias significativas en el largo de los nematodos con respecto al control.
- Rojo: Hubo diferencias significativas en el largo de los nematodos con respecto al control.

Para los ensayos con *P. subcapitata* se asignó:

- Verde: No hubo diferencias significativas en la concentración de algas con respecto al control.
- Rojo: Hubo diferencias significativas en la concentración de algas con respecto al control.

**Tabla 3.5.1.:** Resumen de los resultados obtenidos en los ensayos fisicoquímicos y ecotoxicológicos de las muestras obtenidas en el Arroyo Cañuelas y el Arroyo Navarrete entre noviembre del 2015 y febrero del 2016.

Sitios \ Parámetros	Fisicoquímicos			<i>L. sativa</i> (lechuga)			<i>C. elegans</i> (nematodo)			<i>P. subcapitata</i> (alga)		
	N	D	F	N	D	F	N	D	F	N	D	F
Caño 1	Yellow	Red	Red	Yellow	Yellow	Red	Red	Green	Green	Grey	Red	Red
Caño 205	Grey	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Red	Green	Red	Green	Grey	Red	Red
Caño 0	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Green	Green	Green	Grey	Red	Red
Caño 2	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Yellow	Red	Red	Green	Grey	Red	Red

Al comparar entre los ensayos realizados con *L. sativa* y *P. subcapitata* se encontraron resultados diferentes a pesar de que ambos son productores primarios, lo cual indica la complementariedad de los ensayos. El efecto bioestimulante de algunas muestras sobre ambos organismos ensayados podría indicar un exceso de nutrientes que contribuiría a la eutrofización de los arroyos estudiados. Además, no se debe descartar la presencia de compuestos tóxicos en las muestras que produjeron una bioestimulación, dado que las altas concentraciones de materia orgánica detectadas podrían actuar como un ligando reduciendo la biodisponibilidad de los compuestos tóxicos (Park y Cho, 2008).

En cuanto a los ensayos realizados con *C. elegans*, estos no mostraron una inhibición significativa frente a las muestras con mayor contaminación orgánica. Tampoco se observó una correlación con los otros dos organismos ensayados. En las muestras en donde tanto *C. elegans* como *P. subcapitata* y *L. sativa* mostraron diferencias significativas, el nematodo tuvo una inhibición del crecimiento, mientras que los otros dos organismos ensayados mostraron una exacerbación del crecimiento. Por lo tanto *C. elegans* sería una herramienta útil en la detección de compuestos tóxicos, incluso en ambientes con contaminación orgánica donde muchos compuestos no están biodisponibles para otros organismos.

## 4. CONCLUSIONES

Se analizó la calidad del agua del Arroyo Cañuelas y un arroyo afluente al mismo, ubicados en la provincia de Buenos Aires, en los meses de noviembre del 2015 y diciembre y febrero del 2016 mediante determinaciones fisicoquímicas y ensayos ecotoxicológicos. Los principales resultados fueron:

- Tanto el Arroyo Cañuelas como el Arroyo Navarrete son cursos de agua degradados dado que en ningún monitoreo cumplieron con los niveles guía fijados para la protección de la vida acuática establecido por la autoridad competente (uso V de aguas superficiales fijado por la ACUMAR).
- Río arriba, el Arroyo Cañuelas tiene una mala calidad en sus aguas posiblemente debido al vertido de efluentes orgánicos, siendo no apto para actividades recreativas pasivas (Uso IV fijado por la ACUMAR). Esta degradación de las aguas se reflejó en el bajo oxígeno disuelto (valor mínimo encontrado de 0,25 mg/L), la alta DBO<sub>5</sub>(valor máximo de 16,5 mg/L), la bioestimulación de *L. sativa* y la reducción del crecimiento de *P. subcapitata*.
- Río abajo, la calidad del Arroyo Cañuelas mejora parcialmente, aumentando sus niveles de oxígeno disuelto, DQO, DBO<sub>5</sub>, y aumentando el crecimiento frente a *P. subcapitata*.
- A. Navarrete tiene una mejor calidad de sus aguas con respecto a A. Cañuelas dado que las mismas cumplen con los niveles guía del uso IV fijado por ACUMAR. Sin embargo, estas aguas tuvieron características tóxicas para *C. elegans* en dos de los tres monitoreos, lo cual podría sugerir la presencia de contaminantes.
- Luego de la afluencia de A. Navarrete al A. Cañuelas, este último presenta parámetros que superan los niveles guía del uso IV y produce la exacerbación del crecimiento de *L. sativa*. Sin embargo se observa una mejoría en la calidad de las aguas dado que no se detectó toxicidad con *C. elegans* ni se redujo la tasa de crecimiento con *P. subcapitata*.
- Dada la gran cantidad de información obtenida a través de los bioensayos, se concluye que son una herramienta útil en los estudios de ecosistemas acuáticos, que complementan determinaciones fisicoquímicas y aportan información sobre la calidad toxicológica de los cursos de agua.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

1. Abelovich A., Azov Y., 1975. "Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds". Applied and environmental microbiology.  
<http://aem.asm.org/content/31/6/801.full.pdf+html>
2. ACUMAR, 2010. "Plan Integral de Saneamiento Ambiental de la Cuenca Matanza Riachuelo. Actualización marzo 2010".  
[http://www.acumar.gov.ar/pdf/PLAN\\_INTEGRAL\\_DE\\_SANEAMIENTO\\_AMBIENTAL\\_DE\\_LA\\_CUENCA\\_MATANZA\\_RIACHUELO\\_MARZO\\_2010.pdf](http://www.acumar.gov.ar/pdf/PLAN_INTEGRAL_DE_SANEAMIENTO_AMBIENTAL_DE_LA_CUENCA_MATANZA_RIACHUELO_MARZO_2010.pdf)
3. ACUMAR, 2011. "Cuenca Matanza- Riachuelo: Medición del estado del agua superficial y subterránea, análisis e interpretación de los resultados. Informe trimestral de abril de 2011".  
[http://www.acumar.gov.ar/Informes/Control/CalAmb/Abril2011/CCA\\_ACUMAR\\_INFO\\_AGUA\\_ABRIL\\_2011.pdf](http://www.acumar.gov.ar/Informes/Control/CalAmb/Abril2011/CCA_ACUMAR_INFO_AGUA_ABRIL_2011.pdf)
4. ACUMAR, 2013. "El arroyo Cañuelas duplicó su presencia de oxígeno". Revista ACUMAR en movimiento.  
<http://www.acumar.gov.ar/content/documents/5/3725.pdf>
5. ACUMAR. [www.acumar.gov.ar](http://www.acumar.gov.ar)
6. APHA-AWWA-WPCF, 1992. "Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales". Ediciones Días de Santos.
7. Arellano J., 2002. Introducción a la ingeniería ambiental. Alfaomega.
8. Aruoja V., 2011. "Algae Pseudokirchneriella subcapitata in environmental hazard evaluation of chemicals and synthetic nanoparticles". Estonian University of Life Sciences.  
[www.geoeco.ut.ee/1090551](http://www.geoeco.ut.ee/1090551)
9. AST Ingeniería, Gobierno de España, *et al.*, 2013. "Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica. AST Ingeniería S. L.  
<http://proyectomalgas.com/wp-content/uploads/2014/05/GuiaMicroalgas.pdf>
10. Azov Y., Goldman J. C., 1981. "Free ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive cultures". Applied and environmental microbiology.  
<http://aem.asm.org/content/43/4/735.full.pdf+html>
11. Bain M.B., Stevenson N.J., 1999. "Aquatic habitat assessment, common methods". American Fisheries Society.  
<http://imasd.fcien.edu.uy/difusion/educamb/docs/pdfs/aquaticmethods.pdf>
12. Barbério A., 2013. "Bioassays with plants in monitoring of water quality". Water Treatment.  
<http://www.intechopen.com/books/water-treatment/bioassays-with-plants-in-the-monitoring-of-water-quality>
13. Barrenechea Martel A., 2004. "Tratamiento de agua para consumo humano: plantas de filtración rápida". Organización Panamericana de la Salud (OMS), Centro Panamericano de ingeniería sanitaria y ciencias del ambiente (CEPIS).  
[http://www.ingenieriasanitaria.com/web15/manual1/tomo1/ma1\\_tomo1\\_indice.pdf](http://www.ingenieriasanitaria.com/web15/manual1/tomo1/ma1_tomo1_indice.pdf)
14. Bartram J., Ballance R., 1996. "Water Quality Monitoring: A practical guide to the design and implementation of freshwater quality studies and monitoring programs". PNUMA, OMS.

15. Baudo R., 2001. "Biological monitoring of aquatic ecosystems in Italy". Journal of Limnology. <http://www.jlimnol.it/index.php/jlimnol/article/view/jlimnol.2001.s1.49>
16. Bentrup G., 2008. "Zonas de amortiguamiento para conservación". Departamento de agricultura de los Estados Unidos. [http://nac.unl.edu/buffers/docs/GTR-SRS-109\\_Spanish.pdf](http://nac.unl.edu/buffers/docs/GTR-SRS-109_Spanish.pdf)
17. Blacksmith Institute, Green Cross Switzerland, 2013. "The world 's worst 2013: The top ten toxic threats". [http://www.worstpolluted.org/projects\\_reports/display/114](http://www.worstpolluted.org/projects_reports/display/114)
18. Bohórquez Echeverry P., Campos Pinilla C., 2007. "Evaluación de *Lactuca sativa* y *Selesnatrum capricornutum* como indicadores de toxicidad en aguas". Universitas Scientiarum. <http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/viewFile/4868/3748>
19. Boudou A., Ribeyre F., 1997. "Aquatic ecotoxicology: From the ecosystem to the cellular and molecular levels". Environmental Health Perspectives.
20. Brenner S., 1974. "The genetics of *Caenorhabditis elegans*".
21. BCMELP, British Columbia Ministry of Environment, Lands and Parks; 1998. "Guidelines for Interpreting Water Quality Data". <https://www.for.gov.bc.ca/hts/risc/pubs/aquatic/interp/index.htm>
22. Camaro J. A., Alonso A., 2007. "Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático". Ecosistemas. <https://www.researchgate.net/publication/39439900>
23. Calvijo A., Kronberg F., et al., 2014. "Utilización del nematodo *Caenorhabditis elegans* en ensayos de toxicidad de muestras de agua". Encuentro de investigadores en formación en recursos hídricos. <http://www.ina.gov.ar/ifrh-2014/Eje2/2.19.pdf>
24. Capote O., Lixandro Z., 2010. "Diagnóstico de las condiciones actuales de la microcuenca, y alternativas de recuperación de las riberas del Río Nadadero en el cantón San Lorenzo provincia de Esmeraldas". Universidad técnica del Norte. <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/152>
25. Casal L., 2004. "Turismo rural en Cañuelas: Análisis del potencial de una nueva alternativa económica para la zona del abasto sur". Universidad de Buenos Aires <http://ri.agro.uba.ar/cgi-bin/library.cgi?e=q-00000-00---off-0ti--00-2---0-10-0---0---0direct-10--TE--4-----0-1l--10-es-50---20-about-%E2%80%9CTURISMO+RURAL+EN+CA%C3%91UELAS%3a++AN%C3%81LISIS+DEL+POTENCIAL+DE+UNA++NUEVA+ALTERNATIVA+ECON%C3%93MICA++PARA+LA+ZONA+DE+ABASTO+SUR%2e%E2%80%9D-00-3-1-00-00--4--0-0-0-01-10-0utfZz-8-00&a=d&c=ti&srp=0&srn=0&cl=search&d=cd73>
26. Castillo Morales G, et al., 2004. "Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración resultados y aplicaciones". Instituto Mexicano de Tecnología del agua. <http://www.idrc.ca/EN/Resources/Publications/openebooks/147-7/index.html>

27. CHEbro. <http://www.chebro.es/contenido.visualizar.do?idContenido=28931&idMenu=4109>
28. Clements W., 2010. "Ecotoxicología en ecosistemas fluviales: desde ensayos estandarizados con monocultivos hasta la manipulación del ecosistema". Resúmenes de presentaciones orales del congreso: Contaminantes emergentes y prioritarios: aportaciones de la investigación científica a los planes de gestión de cuencas.  
<http://www3.udg.edu/publicacions/vell/electroniques/bioeffects/esp/pdf/resumenes.pdf>
29. Colautti D., Brancolini F., *et al.*, 2015. "Monitoreo de la ictiofauna en cursos de agua superficial de la Cuenca Matanza Riachuelo". Universidad Nacional de la Plata.
30. Czysz W., Denne A., *et al.*, 1991. "Manual de disposición de aguas residuales: Origen, descarga tratamiento y análisis de las aguas residuales". Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS), Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la salud.  
<http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/scan/026578/Tomo%202/026578-02.pdf>
31. De Paiva Magalhães D., da Costa Marques M. R., 2014. "Selecting a sensitive battery of bioassays to detect toxic effects of metals in effluents". *Ecotoxicology and environmental safety*.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651314003972>
32. Dirección Provincial de Saneamiento y Obras Hidráulicas (DiPSOH), 2011. "Informe 07/11: Arroyo Cañuelas". Laboratorio de Aguas de la Dirección Provincial de Saneamiento y Obras Hidráulicas  
<http://www.canuelasaldia.com.ar/despliegue-noticia.php?idnoticia=572&idseccion=16>
33. Dourojeanni A., Jouravlev A., 1999. "Gestión de cuencas y ríos vinculados con centro urbanos". Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL).  
[http://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/31384/S99120968\\_es.pdf?sequence=1](http://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/31384/S99120968_es.pdf?sequence=1)
34. Faggi A., Breuste J., 2015. "La cuenca Matanza-Riachuelo: Una mirada ambiental para recuperar sus riberas". Universidad Nacional de Flores.
35. Fajardo D., Córdoba R., 2006. "Plan de monitoreo para la planta de tratamiento de aguas residuales en el sur de Ahuachapán, El Salvador". Unión internacional para la Conservación de la Naturaleza y de los Recursos Naturales (UICN).  
<https://portals.iucn.org/library/efiles/documents/2006-092.pdf>
36. Gaspari F.J., *et al.*, 2013. "Elementos metodológicos para el manejo cuencas hidrográficas". Universidad Nacional de La Plata.
37. González F., 2012. "Cañuelas: metropolización y disputas por los usos del suelo". Acta de las VII Jornadas de sociología de la Universidad Nacional de la Plata.  
<http://jornadassocologia.fahce.unlp.edu.ar/actas/Gonzalez-Fernando.pdf>
38. González Pérez Y., Albear Marcos E., *et al.*, 2012. "Aplicación de un bioensayo ecotoxicológico en la evaluación de una mezcla compleja ambiental". *Higiene y sanidad ambiental*.  
<http://www.salud->

[publica.es/secciones/revista/revistaspdf/bc51542cb0968d0\\_Hig.Sanid.Ambient.12.\(1\).839-845.\(2012\).pdf](http://publica.es/secciones/revista/revistaspdf/bc51542cb0968d0_Hig.Sanid.Ambient.12.(1).839-845.(2012).pdf)

39. Gorsuch J. W., Lower W. R., et al., 1991. "Plants for toxicity assessment: Second volume". American Society for Testing Materials (ASTM).  
<https://books.google.com.ar/books?hl=es&lr=&id=2fZ28iFBjMmC&oi=fnd&pg=PA5&dq=lactuca+sativa+toxicity+test&ots=miOREcmDPg&sig=xTafiGPNbMw9YmbGiHKVvbTatVo#v=onepage&q=lactuca%20sativa%20toxicity%20test&f=false>
40. Heidenwag I.; Langheinrich U, *et al.*, 2001. "Self-purification in Upland and Lowland Streams". Acta Hydrochimica et Hydrobiologica.  
[https://www.researchgate.net/publication/230007722\\_Self-purification\\_in\\_Upland\\_and\\_Lowland\\_Streams](https://www.researchgate.net/publication/230007722_Self-purification_in_Upland_and_Lowland_Streams)
41. Herkovitz J., 2015. "Ecotoxicología: una decisión necesaria para el manejo sustentable de cuencas hídricas". Revista Ingeniería Sanitaria y Ambiental.
42. Höss S; Menzel R; *et al.*, 2013. "Effects of insecticidal crystal proteins (Cry proteins) produced by genetically modified maize (Bt maize) on the nematode *Caenorhabditis elegans*". Environmental pollution.
43. Höss S., Ahlf W., *et al.*, 2012. "Interlaboratory comparison of a standardized toxicity test using the nematode *Caenorhabditis elegans* (ISO 10872)". Environmental toxicology and chemistry.  
[https://www.researchgate.net/publication/224868226\\_Interlaboratory\\_comparison\\_of\\_a\\_standardized\\_toxicity\\_test\\_using\\_the\\_nematode\\_Caenorhabditis\\_elegans\\_ISO\\_10872](https://www.researchgate.net/publication/224868226_Interlaboratory_comparison_of_a_standardized_toxicity_test_using_the_nematode_Caenorhabditis_elegans_ISO_10872)
44. INTA. Información meteorológica estación Castelar.  
<http://rian.inta.gov.ar/agrometeorologia/consultasprecipitaciones/InformeVariable.aspx?T=P>
45. <http://www.canuelas.gov.ar/index.php/noticias/ultimas-noticias/145-prensa-2014may/3347-avanza-el-saneamiento-del-arroyo-canuelas>
46. Huarachi R., Dueñas A., *et al.*, 2014. "Ecotoxicological assessment with *Pseudokirchneriella subcapitata* (chlorophyta) and physicochemical parameters in the upper- middle part of camana- majes- colca basin (Arequipa – Peru). The Biologist (Lima).  
[https://www.researchgate.net/publication/271139017\\_ECOTOXICOLOGICAL\\_ASSESSMENT\\_WITH\\_PSEUDOKIRCHNERIELLA\\_SUBCAPITATA\\_CHLOROPHYTA\\_AND\\_PHYSICOCHEMICAL\\_PARAMETERS\\_IN\\_THE\\_UPPER-MIDDLE\\_PART\\_OF\\_CAMANA-MAJES-COLCA\\_BASIN\\_AREQUIPA-PERU](https://www.researchgate.net/publication/271139017_ECOTOXICOLOGICAL_ASSESSMENT_WITH_PSEUDOKIRCHNERIELLA_SUBCAPITATA_CHLOROPHYTA_AND_PHYSICOCHEMICAL_PARAMETERS_IN_THE_UPPER-MIDDLE_PART_OF_CAMANA-MAJES-COLCA_BASIN_AREQUIPA-PERU)
47. ILPLA, 2015. "Monitoreo de la ictiofauna en cursos de agua superficiales de la cuenca hidrográfica Matanza Riachuelo". Instituto de limnología Dr. R. A. Ringuelet.  
<http://www.acumar.gob.ar/content/documents/7/4507.pdf>
48. Källqvist T., 1984. "Fresh Water Monitoring: The application of an algal assay to assess toxicity and eutrophication in polluted streams". Pergamon Press.
49. Leung M; Williams P; *et al.*, 2008. "Caenorhabditis elegans: an emerging model in biomedical and environmental toxicology". Toxicological Sciences.  
<http://toxsci.oxfordjournals.org/content/106/1/5.full>

50. Lewis J.A, Fleming J.T, 1995. "Methods in cell biology: Basic culture methods". Elsevier.
51. Luna D., Salusso M., *et al.*, 2002. "Proceso de autodepuración de ríos y embalses del noroeste argentino (Salta y Tucumán). Congreso regional de ciencia y tecnología NOA 2002. <http://www.editorial.unca.edu.ar/Publicacione%20on%20line/CD%20INTERACTIVOS/NOA2002/Proceso%20Autodepuracion%20Rios.pdf>
52. Machado M.,Soares E., 2013. "Modification of cell volume and proliferation capacity of *Pseudokirchneriella subcapitata* cells exposed to metal stress". Aquatic toxicology. [https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/32110/1/document\\_17064\\_1.pdf](https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/32110/1/document_17064_1.pdf)
53. Malpartida A. R., 2004. "Revisión de antecedentes: Recursos Naturales. Compuestos xenobióticos y otros polutantes de la cuenca". Universidad Tecnológica Nacional.
54. Marín Galvín R., 2003. "Fisicoquímica y microbiología de los medios acuáticos: Tratamiento y control de calidad de aguas". Ediciones Díaz de Santos.
55. Martínez Espejo R., 2010. "Descontaminación de efluentes de la industria cervecera mediante el uso de membranas UF arrolladas en espiral como barrera de seguridad". Universidad Católica San Antonio. <http://repositorio.ucam.edu/jspui/bitstream/10952/59/1/Tesis%20Doctoral%20PDF.pdf>
56. Martínez Soza L., 2010. "Estudio de la evolución de una ETAP para la adecuación legislativa". Universidad Politécnica de Cataluña. <http://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/10383/Annex.pdf?sequence=3>
57. Massol-Deyá A.; Fuentes F., 2002. "Manual de laboratorios: Ecología de microorganismos", Universidad de Puerto Rico. <http://www.uprm.edu/biology/profs/massol/manual/p1-intro.pdf>
58. Mendoza Cantú A., Ramírez P., *et al.*, 2013. "Intercalibración de las pruebas con *Daphnia magna* y *Pseudokirchneriella subcapitata* en México: herramientas potenciales para el monitoreo ambiental". Revista hidrobiológica
59. Menendez A. N., Lecertúa E. A., *et al.*, 2015. "Numerical modeling to define actions for water quality in streams". Journal of applied water engineering and research. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/23249676.2015.1072850?journalCode=tjaf20>
60. Menone M. L., 2015. "Encubridoras por naturaleza: Las plantas acuáticas ocultan los secretos de la contaminación". Revista ciencia e investigación. <http://aargentinapciencias.org/2/index.php/revistas-cei2/894-tomo-65-no-2-2015>
61. Moya A., Kronberg F, *et al.*, 2015. "Plaguicidas disruptores endócrinos, uso del nematodo *Caenorhabditis elegans* como modelo biológico". Senasa publicación periódica científico-tecnológica.
62. Navarro A.R., Arrueta R.G.,*et al.*, 2006. "Determinación del efecto de diferentes compuestos a través de ensayos de fitotoxicidad usando semillas de lechuga, escarola y achicoria". Revista de toxicología. <http://rev.aetox.es/wp/wp-content/uploads/hemeroteca/vol23-23/revtox.23.2-3.2006.pdf>

63. Olguín H.; Puig A.; Loez C., *et al.*, 2004. "An integration of water physicochemistry, algal bioassay, phytoplankton and zooplankton for ecotoxicological assessment in a highly polluted lowland river". *Journal of water, air and soil pollution*.
64. OECD, Organization for economic co-operation and development, 2011. "Guidelines for testing chemicals, section 2, Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test".  
[http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-201-alga-growth-inhibition-test\\_9789264069923-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-201-alga-growth-inhibition-test_9789264069923-en)
65. Olguín Salinas H., 2004. "An Integration of Water Physicochemistry, Algal Bioassays, Phytoplankton, and Zooplankton for Ecotoxicological Assessment in a Highly Polluted Lowland River". *Water Air and Soil Pollution*.  
<https://www.researchgate.net/publication/225886285>
66. Ortiz L. L., 2009. "Contaminación del agua por nitratos: significación sanitaria". *Revista Archivo Científico de Camagüey*.  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1025-02552009000200017&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1025-02552009000200017&script=sci_arttext)
67. Park Ji-Hyung, Cho Jaeweon, 2008. "Effect of dissolved organic matter on the growth of algae, *Pseudokirchneriella subcapitata*, in Korean lakes: The importance of complexation reactions". *Ecotoxicology and environmental safety*.  
<https://www.researchgate.net/publication/5537994>
68. Peña Salamanca J. E., Palacios Peñarda M.L, *et al.*, 2005. "Algas como indicadoras de la contaminación". Universidad del Valle.
69. Pittman J. K., Dean P. A., *et al.*, 2011. "The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources". *Bioresource Technology*.  
[https://www.researchgate.net/publication/44901352\\_The\\_Potential\\_of\\_Sustainable\\_Algal\\_Biofuel\\_Production\\_Using\\_Wastewater\\_Resources](https://www.researchgate.net/publication/44901352_The_Potential_of_Sustainable_Algal_Biofuel_Production_Using_Wastewater_Resources)
70. Poder judicial de la Nación, 2001. "MENDOZA, Beatriz Silvia y o/s. c/ ESTADO NACIONAL y o/s. s/ EJECUCIÓN DE SENTENCIA. Anexo II: Criterios utilizados para la definición de los valores asociados a cada zona de uso."  
<http://www.acumar.gov.ar/ACUsentencias/CausaMendoza/2009abril/060409e/AnexoIIusos060409.pdf>
71. Preston B., 2002. "Indirect effects in aquatic ecotoxicology: Implications for ecological risk assessment". *Journal of environmental management*.  
[https://www.researchgate.net/publication/11529462\\_Indirect\\_Effects\\_in\\_Aquatic\\_Ecotoxicology\\_Implications\\_for\\_Ecological\\_Risk\\_Assessment](https://www.researchgate.net/publication/11529462_Indirect_Effects_in_Aquatic_Ecotoxicology_Implications_for_Ecological_Risk_Assessment)
72. Quaini Karina P., 2011. "Análisis espacio temporal de un índice de incidencia antrópica en la cuenca la Matanza Riachuelo, Provincia de Buenos Aires". Universidad Nacional de Córdoba.  
<http://www.famaf.unc.edu.ar/wp-content/uploads/2014/04/5-Gulich-QUAINI.pdf>
73. Ramirez F., 2007. "El muestreo del agua. Toma y conservación de muestras"  
<http://www.elaguapotable.com/El%20muestreo%20de%20los%20distintos%20tipos%20de%20agua.pdf>

74. Repetto M., Sanz P., 1995. "Glosario de términos usados en toxicología. Recomendaciones de la IUPAC- 1993". Asociación española de toxicología.
75. Ribeiro Rodrigues L.H., Arenzon A., et al., 2011. "Algal density assessed by spectrophotometry: A calibration curve for unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*". Journal of environmental chemistry and ecotoxicology.  
<https://www.researchgate.net/publication/236851259>
76. Riddle D; Blumenthal B; et al., 1997. "C. elegans II". Cold Spring Harbor Laboratory Press.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20086/>
77. Rivas Sánchez G., Giovanna Vera D., 2001. "Manual introductorio de ecotoxicología acuática". Instituto del Mar del Perú.
78. Rodier J., 1998. "Análisis de las aguas: aguas naturales, aguas residuales y aguas del mar". Ediciones Omega.
79. Rodríguez R., 2001. "Estudio de la contaminación por metales pesados en la cuenca del Llobregat". Universidad Politécnica de Cataluña.  
<http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6978/04ComponentesAguas05.pdf>
80. Rodríguez Romero A. J., Robles Salazar C. A., 2014. "Índices de germinación y elongación radical de *Lactuca sativa* en el biomonitorio de la calidad del agua del Río Chalma". Revista Internacional de Contaminación Ambiental.  
<https://www.researchgate.net/publication/264384154>
81. Romero H., Vásquez A., 2005. "Evaluación ambiental del proceso de urbanización de las cuencas del piedemonte andino de Santiago de Chile". Revista Eure.  
<http://www.scielo.cl/pdf/eure/v31n94/art06.pdf>
82. Sabater C., Carrasco J.M., 2000. "Effects of pyridaphenthion on growth of five freshwater species of phytoplankton. A laboratory study". Chemosphere.
83. Secretaria de economía mexicana, 2008. "Análisis de agua, aguas naturales, epicontinentales, costeras y marinas, muestreo. Parte 2: Guía para los ensayos biológicos de muestras".  
<http://legismex.mty.itesm.mx/normas/AA/proy0909/proy-nmx-aa-121-2-scfi08.pdf>
84. Segner H., Möller A.M., 2010. "Aplicabilidad y limitaciones en el uso de los biomarcadores". Resúmenes de presentaciones orales del congreso: Contaminantes emergentes y prioritarios: aportaciones de la investigación científica a los planes de gestión de cuencas.  
<http://www3.udg.edu/publicacions/vell/electroniques/bioeffects/esp/pdf/resumenes.pdf>
85. Serpa D., Cassidy J., 2014. "Assessment of river water quality using an integrated physicochemical, biological and ecotoxicological approach". Environmental sciences, Processes and impacts.  
<http://www.researchgate.net/publication/261516750>
86. Solano Padilla A.E., 2007. "Ensayo de toxicidad aguda al efluente del municipio de Chía mediante la utilización de semillas de *Lactuca sativa* y propuestas para su utilización como agua de riego para hortalizas". Universidad de la Salle.  
<http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/14933/41992120.pdf?sequence=1>










87. Sorrequieta A., 2004. "Aguas residuales: Reuso y tratamiento. Lagunas de estabilización: Una opción para Latinoamérica". Universidad Nacional de Rosario.  
[http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/2784/mod\\_resource/content/0/2\\_Aguas\\_residuales\\_protegido .pdf](http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/2784/mod_resource/content/0/2_Aguas_residuales_protegido.pdf)
88. UK Environment Agency, 2008. "The direct toxicity assessment of aqueous environmental samples using the Pseudokirchneriella subcapitata freshwater algal growth inhibition test (2008)".  
[https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/316789/biobook219\\_2060295.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/316789/biobook219_2060295.pdf)
89. United States Environmental Protection Agency, 2002. "Short term Methods for Estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms".  
[https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/method\\_1003\\_2002.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/method_1003_2002.pdf)
90. Universidad Nacional de la Plata (UNLP), 2015. "Evaluación de la sensibilidad de diferentes especies acuáticas, presentes en la Cuenca Matanza Riachuelo, expuestas a diversos contaminantes determinados en la misma".
91. Whitford F., Urban D., *et al.*, 2003. "Pesticides and ecological risk assessment: history, science and process". Purdue University.  
<http://riskmgmt.uwagec.org/HumanRisk/Pesticides&EcoRiskassessmentpdf.pdf>
92. WorldResourcesInstitute, 2005. "Los Ecosistemas y el Bienestar Humano: Humedales y Agua. Informe de Síntesis".  
[http://www.unep.org/maweb/documents/MA\\_WetlandsandWater\\_Spanish.pdf](http://www.unep.org/maweb/documents/MA_WetlandsandWater_Spanish.pdf)
93. Zimmerman E.; Basile P., 2000. "Análisis de la modificación en la respuesta hidrológica del sistema del arroyo Ludueña provocada por cambios en el uso del suelo". Universidad Nacional de Rosario.  
<http://www.fceia.unr.edu.ar/curiham/Secciones/Publicaciones/Hidrologia%20ambiental/Zimmermann%20et%20al%202001.pdf>
94. Zhou G., Bi Y., *et al.*, 2009. "Algal growth potential and nutrient limitation in spring in Three-Gorges Reservoir, China". Fresenius Environmental Bulletin.  
[https://www.researchgate.net/publication/268819438\\_Algal\\_growth\\_potential\\_and\\_nutrient\\_limitation\\_in\\_spring\\_in\\_Three-Gorges\\_Reservoir\\_China](https://www.researchgate.net/publication/268819438_Algal_growth_potential_and_nutrient_limitation_in_spring_in_Three-Gorges_Reservoir_China)

## 6. Anexo Fotográfico

Figura 6.1.: Fotos del muestreo realizado en diciembre.

Sitio de muestreo	Río arriba	Río Abajo	Detalles
Cañu 1			
Cañu 205			
Cañu 2			
Cañu			

Figura 6.1.: Fotos del muestreo de febrero.

Sitio de Muestreo	Río Arriba	Río Abajo	Detalles
Caño 1			
Caño 205			
Caño 2			
Caño	