

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo
2016

Impacto de agroquímicos en arroyos de cuencas rurales

**Tesis presentada para optar por el título
de Doctor en Ciencias Naturales**

Licenciada Marina Laura Solis

Director Carlos Bonetto
Co-Director Hernán Mugni

Agradecimientos

La realización de este trabajo de tesis ocupó algunos años de mi vida y el agradecimiento a todos los que me acompañaron es infinitamente grande. Agradezco a mis directores Carlos Bonetto y Hernán Mugni por haberme elegido. Por su incondicionalidad, por haberme incentivado y guiado. Por todas y cada una de las peleas, por cada consejo, porque me acompañaron siempre. Gracias por la dedicación exclusiva durante la redacción de ésta tesis.

A mis compañeros de laboratorio por su gran colaboración y tiempo compartido; Ana Scalise, Marina Arias e Ignacio García. A Silvia Fanelli por su química y amistad. A Ariel Paracampo por su gran ayuda con la estadística y el aguante cotidiano. Especialmente a Natalia Marrochi por su amistad y compañerismo; por todos los momentos compartidos en el campo y laboratorio, sin su ayuda todo hubiese sido más difícil. Gracias a todos!!!

A Hernán Benitez y Roberto Jensen por las campañas compartidas. A todos los chicos del laboratorio de sistemática, especialmente a Melina Mauad por su ayuda siempre que la necesité. Al laboratorio de bacteriología, a Jorge Donadelli y Hugo Di Giorgi. A Carolina Monti por su búsqueda bibliográfica. A Luciana De Tezanos por su ayuda gráfica. A todos mis compañeros que compartimos diariamente el ILPLA. A los chicos de planta baja por todos los almuerzos compartidos.

A Liliana Bosch por su incondicional inglés.

Agradezco a mis padres, mis grandes pilares en la vida y ejemplo a seguir. A mis hermanos Diego, Emiliano y Matias por estar siempre acompañándome en mis logros, porque mejor no podrían ser. A mi pequeña y gran familia, tíos, primos, cuñadas y sobrinos. A Ayelén Darcangelo por todo el andar.

A Gonzalo Legarreta por haberme aconsejado seguir por este camino. A mis amigos de la facultad. A mis amigos de la vida, los que están junto a mí, especialmente a Natalia Falcón por su ayuda y apoyo siempre que lo necesité. A mis amigas las gauchas.

A la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, ILPLA, ANPCyT y CONICET por brindarme los medios para la realización de esta tesis.

Agradezco a mi amiga y hermana del alma Lorena González.

Este logro es por las dos, en tu memoria.

Índice

Resumen	5
Summary	8
I. Introducción	11
Hipótesis	20
Objetivos	21
II. Estudio de campo	22
Área de estudio	24
Materiales y métodos	38
Datos ambientales	38
Análisis químicos	38
Nutrientes	38
Clorofila	38
Análisis de biocidas	39
Muestras de macroinvertebrados	39
Análisis estadístico	42
Primera etapa	45
Resultados	45
Parámetros físicos y químicos	45
Biocidas	46
Ensamble de macroinvertebrados	47
Discusión	53
Segunda etapa	58
Resultados	58
Parámetros físicos y químicos	58
Biocidas	60
Ensamble de macroinvertebrados	61
Discusión	70
Tercera etapa	75
Resultados	75
Parámetros físicos y químicos	75
Biocidas	76

Ensamble de macroinvertebrados	77
Discusión	85
III. Ensayos de toxicidad	90
Ensayos de toxicidad aguda	92
Materiales y métodos	92
Ensayo de toxicidad para Roundup	93
Determinación del Roundup	93
Ensayo de toxicidad para biocidas	94
Endosulfan	94
Clorpirifos	94
Determinación de los biocidas	95
Análisis de datos	96
Resultados y discusión	97
Roundup	97
Endosulfan	100
Clorpirifos	101
Cipermetrina	103
Comparación de LC ₅₀ – 48 hs	104
Ensayos subletales	106
Diseño experimental	106
Ensayo de toxicidad I: Simulación de un pulso de toxicidad	106
Ensayo de toxicidad II: Efectos en la formación de amplexos	107
Ensayo de toxicidad III: Simulación de eventos de escorrentía	108
Resultados	109
Ensayo de toxicidad I: Simulación de un pulso de toxicidad	109
Ensayo de toxicidad II: Efectos en la formación de amplexos	109
Ensayo de toxicidad III: Simulación de eventos de escorrentía	110
Discusión	110
IV. Conclusiones	114
Bibliografía	118

Resumen

En las últimas décadas se produjo un aumento de la producción agrícola como consecuencia de la introducción de nuevas tecnologías y prácticas de manejo, donde el hecho más significativo fue la introducción de la soja transgénica y su progresivo incremento hasta representar en la actualidad el principal cultivo de la región. La soja y sus derivados constituyen el rubro más importante de exportación de Argentina, uno de los mayores productores del mundo. Desde los años 70, la superficie sembrada con soja ha crecido en forma sostenida. Mientras que en la campaña 70/71 se cultivaron 37.700 ha en la campaña 2014 – 2015 se alcanzaron las 19,8 millones ha. El consumo de biocidas aumentó de 6 millones de kilogramos en 1992 a 32 millones en 2012. Los agrotóxicos más utilizados en nuestra región son el herbicida glifosato y los biocidas cipermetrina, clorpirifos y endosulfan. La misma tendencia se observa con el uso de fertilizantes. Durante el período 1991-2007, aumentó a una tasa anual promedio del 18% (174 mil toneladas por año), siendo de 3.2 millones de toneladas para el 2013.

El objetivo de la presente tesis es evaluar el efecto de la aplicación de agroquímicos en los cultivos sobre los cuerpos de agua adyacentes. Se comparó la concentración de agrotóxicos y nutrientes y la composición del ensamble de macroinvertebrados en arroyos de cuencas con uso del suelo contrastante. Así mismo se realizaron ensayos de toxicidad en el laboratorio por medio de los cuales se estudió la toxicidad aguda y crónica de los agrotóxicos más utilizados en nuestra región sobre el anfípodo *Hyaella curvispina*.

Los sitios de estudio corresponden al grupo de tributarios del Río de La Plata, entre la ciudad de La Plata y Punta Indio. Los muestreos se realizaron durante 3 períodos consecutivos, abarcando distintos ciclos de cultivos, entre Diciembre 2011-Marzo 2014. Se estudiaron los arroyos Remes, Afluente Pescado y Gato, en sitios adyacentes a parcelas con agricultura, Poblet, Ignacio Correa, Arregui y Sin Nombre en sitios adyacentes a parcelas con ganadería sobre pasturas naturales y Juan Blanco, Destino, Morales y Confluencia en la Resera de la biosfera Parque Costero Sur.

Durante todo el período de muestreo, las mayores concentraciones de agrotóxicos y nutrientes se determinaron en los arroyos de cuencas agrícolas. Durante los tres períodos de muestreo se observó que el ensamble de macroinvertebrados de los sitios agrícolas fue significativamente diferente al resto de los sitios.

En ocasiones se determinaron diferencias entre los arroyos de las cuencas ganaderas, que resultaron similares a los de la reserva que cuentan con igual tipo de vegetación acuática sugiriendo que la cubierta vegetal tiene mayor influencia en el ensamble que el eventual efecto de la ganadería. En el arroyo Afluente Pescado el cultivo se encontraba dejando una franja de suelo con pastura natural sin cultivar contigua al arroyo y se observó un efecto de atenuación de impacto en el ensamble de macroinvertebrados. Los resultados obtenidos confirman el efecto protector de las franjas de atenuación y enfatizan su utilidad como norma de manejo para la mitigación del impacto.

Se concluye que la exposición a los agrotóxicos es la principal causa de las diferencias observadas en la composición del ensamble de macroinvertebrados. La intensificación agrícola en curso indujo un cambio hacia una fauna de macroinvertebrados con mayor abundancia de taxones tolerantes a agrotóxicos como Planorbidae, Ancyliidae, Glossiphoniidae, Aeshnidae, Sphaeriidae y Dugesiidae y la ausencia o disminución de taxones sensibles como Hyalellidae (*Hyalella*), Coenagrionidae, Caenidae, Polycentropodidae, Stratiomyiidae.

Se determinaron las LC_{50} – 48 hs para *H. curvispina* de los agrotóxicos más utilizados en nuestra región (Glifosato, Endosulfan y Clorpirifos). Se comparó la sensibilidad de *H. curvispina* con la de otras especies por medio de la distribución de sensibilidad de especies (SSDs) y se estimó el riesgo ecológico por medio del cociente entre la concentración determinada en el ambiente / LC_{50} (HQ) para endosulfan, glifosato, clorpirifos y cipermetrina. Se demostró que la cipermetrina fue el agrotóxico más tóxico para *H. curvispina* con un valor de LC_{50} - 48 hs de 0.066 $\mu\text{g/l}$ y un valor de HQ de 10.75, seguido por clorpirifos con un valor de 0.38 $\mu\text{g/l}$ y un HQ 1.18. El endosulfan resultó ser el menos tóxico con una LC_{50} - 48 hs de 16.8 $\mu\text{g/l}$ y un HQ de 2.3. Si bien endosulfan registró la menor toxicidad (16.8 $\mu\text{g/l}$) representó un mayor riesgo que clorpirifos (HQ=2,3), probablemente asociado a su mayor persistencia en el ambiente. El valor HQ del herbicida Roundup sugiere un bajo riesgo de toxicidad aguda para *H. curvispina* (LC_{50} – 48 hs de 9,9 mg/l y un HQ de 0,07 mg/l).

Se realizaron ensayos de toxicidad subletal con el anfípodo *H. curvispina*. Se observó la ocurrencia de efectos subletales a concentraciones muy bajas de los biocidas, órdenes de magnitud inferior a las concentraciones letales, que producen distintos tipos de respuestas que pueden afectar potencialmente la composición del ensamble de macroinvertebrados acuáticos.

Se concluye que el uso del ensamble de macroinvertebrados acuáticos es una herramienta eficaz en la evaluación de los efectos ecológicos producidos por la producción agrícola en arroyos de la Región Pampeana.

Summary

There has been an increase in agricultural production as a result of the introduction of new technologies and management practices over the last decades. The most significant event was the introduction of genetically modified (GM) soybeans and its progressive use/application to represent the main crop of the region now a days.

Soybean and its derivatives represent Argentina's main exports, being our country the largest soybeans producer in the world. Since the 70s, the soybean planted area has grown steadily. In the 70/71 campaign 37,700 ha were cultivated, while the 2014 - 2015 campaign reached 19.8 million ha.

The consumption of pesticide has increased from 6 million kilograms in 1992 to 32 millions in 2012. The most ordinary agricultural chemicals used in our region are the glyphosate herbicide, cypermethrin, chlorpyrifos and endosulfan. The growing trend is towards the use of fertilizers. It increased at an average annual rate of 18% (174,000 tons per year) during the period 1991-2007 and it reached 3.2 million tons in 2013.

The aim of this thesis is to evaluate the effect of the application of chemicals on inland waters adjacent to crops. The concentration of pesticides and nutrients and the composition of the assemblage of macroinvertebrates were compared with contrasting soil in the basins. Furthermore, toxicity tests were performed in the laboratory in order to assess the acute and chronic toxicity of the most used agrochemicals in our region on the amphipod *Hyalella curvispina*.

The studied sites belong to a group of tributary streams of La Plata River, between the cities of La Plata and Punta Indio. Sampling was conducted in three periods, covering different crop cycles from December 2011 to March 2014. Remes, Pescado and Gato tributaries streams were studied in areas adjacent to agriculture plots. Poblet, Ignacio Correa, Arregui and Sin Nombre sites were studied in areas adjacent to livestock plots with natural pastures lands; and Juan Blanco, Destino, Morales and Confluencia in the Parque Costero Sur biosphere reserve.

Throughout the sampling period, the highest concentrations of pesticides and nutrients were found in the streams of agricultural catchments. During the three

sampling periods it was observed that the assemblage of macroinvertebrates in agricultural sites was significantly different from other sites.

Some differences among livestock streams basins were determined, which were similar to those having the same type of aquatic vegetation located at the reserve, inferring that vegetation cover has more influence on the assemblage than the possible effect of livestock. At Pescado stream it was observed that the growing crops were located beside a strip of uncultivated land with natural pasture next to the stream, and additionally, a mitigation of the effect on the assemblage of macroinvertebrate was observed. These results show the protective action of the attenuation bands and emphasize its use for impact mitigation as a management standard.

The exposure to pesticides is the main cause of the composition differences in the assemblage of macroinvertebrates that were examined. The current agricultural intensification lead change in the invertebrate fauna into more abundant taxonomies tolerant to pesticides as Planorbidae, Ancylidae, Glossiphoniidae, Aeshnidae, Sphaeriidae and Dugesiidae and the decrease or absence of sensitive taxonomies as Hyalellidae (*Hyalella sp.*), Coenagrionidae, Caenidae, Polycentropodidae and Stratiomyiidae.

The LC₅₀ 48 hours for *H. curvispina* of the most used agrochemicals in our region (Glyphosate, endosulfan and chlorpyrifos) was determined. In addition, the sensitivity of *H. curvispina* was compared with other species through species sensitivity distribution (SSDs); and the ecological risk was estimated by the quotient of the determined environment concentration / LC₅₀ (HQ) for endosulfan, glyphosate, chlorpyrifos and cypermethrin. As a result, it was shown that cypermethrin represented the largest hazard for *H. curvispina* with a value of LC₅₀ 48 h of 0.066 mg/l and a value of HQ 10.75, followed by chlorpyrifos with a value of 0.38 mg/l and HQ 1.18. Endosulfan was the least toxic with a value of LC₅₀ 48 h 16.8 mg/l and 2.3 HQ. Although endosulfan had the lowest toxicity rate (16.8 g/l), it represented a higher risk than chlorpyrifos (HQ = 2.3), probably related to the lasting persistence it has in the environment. The acute toxicity of Roundup herbicide suggests a low risk of acute toxicity for *H. curvispina* as a consequence of Roundup applications on areas adjacent to crops (LC₅₀ 48 h 9.9 mg/l and HQ 0.07 mg/l).

Sublethal toxicity tests on the amphipod *H. curvispina* were made. Therefore, the occurrence of sublethal effects was observed, at very low pesticides concentration,

lesser than lethal concentrations, which may produce different types of responses that would potentially affect the composition of the aquatic macroinvertebrates assemblages. To sum up, the use of assemblages of aquatic macroinvertebrates is an effective tool to assess the ecological effects of agricultural production on the streams of the Pampas region.

I

Introducción

Hipótesis y objetivos

INTRODUCCIÓN

La región pampeana cuenta con alrededor de 60 millones de hectáreas de las cuales están cultivadas más de 23 millones, representando alrededor del 60 % de toda la producción agrícola nacional (CASAFE 2009). Históricamente la productividad agrícola en Argentina ha tenido estrechas vinculaciones con los cambios tecnológicos (CASAFE 2009).

A partir del año 1965 hasta transcurrido el año 1990, luego del estancamiento que caracterizó las décadas anteriores, se produce una expansión agrícola impulsada por el incremento de la productividad, como consecuencia de los cambios tecnológicos basados en la mecanización, empleo de semillas híbridas, nuevos herbicidas y métodos de aplicación. Tradicionalmente, los agricultores empleaban un sistema mixto de producción ganadera y agrícola, basada fundamentalmente en los cultivos de maíz/trigo. Durante los años 80' se produce una fuerte expansión en la producción de granos y en el modo de producir, a través de la mecanización y el uso creciente de agroquímicos y fertilizantes. En las décadas siguientes el proceso se profundiza, permitiendo un mejor manejo de los suelos, acortando los tiempos de siembra y cosecha. Actualmente variedades de trigo y soja con un período corto de crecimiento permite dos cosechas por año, trigo seguido de soja. La ganadería se trasladó a áreas marginales o se ha centrado en sistemas de confinamiento intensivo conocidos como “feedlots”.

En las últimas décadas, Argentina experimenta un incremento en la producción agroindustrial (CASAFE 2009). Dentro de las nuevas prácticas de manejo, un hecho significativo fue la consolidación del cultivo de soja. La introducción de semilla transgénica de soja, junto con la aplicación de glifosato y cultivo bajo el método de siembra directa, conformaron un nuevo paquete tecnológico integral. El poroto de soja y sus derivados (pellets, aceites, harinas, etc.) constituyen el principal rubro de exportación de la Argentina (Aizen et al. 2009). Estados Unidos, Brasil, Argentina, China e India son los 5 principales países productores de soja. En Sudamérica, la soja está muy extendida en Brasil, Argentina, Uruguay, Paraguay y Bolivia (Bindraban et al. 2009). La modalidad de producción conocida como “siembra directa” requiere de varias aplicaciones de herbicidas para el control de malezas y es recomendada para disminuir la erosión, la cual ocasionó durante mucho tiempo una pérdida significativa de los suelos por arrastre de la escorrentía superficial.

Es notable el crecimiento de cada uno de los componentes del nuevo paquete tecnológico, el cambio más evidente estuvo representado por un gran incremento en la producción de soja, en los años 70' la superficie sembrada se estimaba en 38.000 hectáreas, mientras que en la campaña agrícola 2014 – 2015 ascendió a 17,8 millones de hectáreas (MAGyP 2016). El consumo de fertilizantes se incrementó los últimos 20 años. En el período 1991-2007, el consumo aumentó a una tasa anual promedio del 18 % (174 mil toneladas por año), siendo de 3.2 millones de toneladas en el 2013 (CIAFA 2016). Asimismo, el consumo de agrotóxicos también aumentó de 6 millones de kilogramos en 1992 (Pengue 2000) a 32 millones de kilogramos en 2012 (CIAFA 2016).

Hacia finales de la década de los 70, los análisis químicos eran los métodos más utilizados para evaluar la calidad de las aguas. Las limitaciones de estos para detectar efectos en la biota de los sistemas acuáticos, cuando ellos son el resultado de perturbaciones no puntuales de origen difuso, hizo revalorizar los métodos biológicos como alternativa para el monitoreo de las condiciones de los cuerpos de agua. Los macroinvertebrados acuáticos son uno de los grupos más utilizados en la bioevaluación. En términos generales puede decirse que la biota acuática cambia su estructura y funcionamiento al modificarse las condiciones ambientales de sus hábitats naturales. De modo que es posible usar algunas características o propiedades estructurales y funcionales para evaluar en forma comparativa el estado de la biota, cuya condición es reflejo del estado ecológico del cuerpo de agua (Segnini 2003).

Asimismo los ensayos biológicos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Se han desarrollado diferentes protocolos para pruebas de toxicidad (USEPA 2000, 2002, APHA 1998) que incluyen la evaluación de tóxicos de referencia sobre especies de prueba, tendiendo a maximizar la reproductibilidad y confiabilidad de los datos obtenidos (Buikema et al. 1982). Para evaluar todos los efectos posibles sobre el ecosistema bajo las diversas condiciones abióticas y bióticas presentes, no existe un organismo que pueda ser utilizado. En la práctica, solamente unas pocas especies (especies modelo) pueden ser ensayadas ya que son fáciles de manipular en el laboratorio, de fácil reproducción y de lectura de los efectos de las respuestas, entre otras. Amphipoda es muy utilizado en bioensayos de ecotoxicología para evaluar la toxicidad de los agrotóxicos en la fauna de invertebrados no blanco (Borgmann et al. 1989, Adam et al. 2009, Xuereb et al. 2009, Dutra et al.

2009, Wheelock et al. 2005). Entre los crustáceos acuáticos *Daphnia sp*, *Ceriodaphnia sp*, *Gammarus sp* y *Hyaella sp*, son usados en ensayos de toxicidad por varias razones, incluyendo su elevada sensibilidad a tóxicos, amplia distribución en ambientes acuáticos y facilidad de cultivo bajo condiciones de laboratorio. La familiaridad con el organismo y la disponibilidad de una gran base de datos puede haber contribuido a su popularidad (Hickey 1989). Debido a su amplia distribución en México y EEUU, *Hyaella azteca* es usada como un organismo de ensayo para investigaciones de toxicidad en ambientes acuáticos en Norteamérica. *Hyaella azteca* sin embargo está ausente en Sudamérica. El anfípodo de agua dulce *Hyaella curvispina* tiene una amplia distribución y es a menudo el invertebrado más abundante en las comunidades epifíticas y bentónicas de ambientes someros en el sur de Sudamérica (García et al. 2010). Se extiende desde Río de Janeiro; Brasil, en la Costa Atlántica (22°S; 43°W) a Punta Arenas, Chile, en el Pacífico (53°S, 70°W) (Somma et al. 2011). Esta amplia distribución se solapa con la mayoría de las áreas agrícolas de Sudamérica, incluyendo los países productores más importantes, Brasil, Argentina, Uruguay, Paraguay y Bolivia (Brindraban et al. 2009). Por todo esto, *H. curvispina* representa un buen modelo para la evaluación de riesgo ambiental.

La población humana continúa aumentando y con ella la demanda de alimentos que se acrecentó en los últimos años por encima del aumento de la población debido al significativo incremento del consumo en algunos países en desarrollo, tales como China e India, entre otros. La agricultura ocupa en la actualidad $15,3 \times 10^6$ km², representando el principal bioma global (Stehle & Schulz 2015). El consumo de agrotóxicos se incrementó en más del 750% en el período 1955- 2000 (Tilman et al. 2001). La aplicación masiva de agroquímicos constituye un riesgo para ecosistemas no blanco, típicamente los cursos de agua de zonas agrícolas. Existe un creciente reconocimiento que las fuentes difusas de contaminación generadas por la agricultura representan la mayor causa de degradación de las aguas continentales. El acelerado deterioro de los ambientes acuáticos representa en la actualidad el mayor desafío para la sustentabilidad de la intensificación agropecuaria en curso (Stehle & Schulz 2015). A pesar de existir normativas sobre la utilización de agroquímicos en los cultivos y sobre los umbrales de concentraciones aceptables de distintos agroquímicos que se monitorean rigurosamente, las concentraciones de agroquímicos en aguas superficiales en Europa son un riesgo para la fauna acuática (Malaj et al. 2014). Liess & Von der Ohe (2005) clasificaron y agruparon las especies en función de su sensibilidad a los

agrotóxicos en especies en riesgo (SPEAR) y no en riesgo (SPEnotAR). Sus resultados mostraron que a concentraciones de biocidas de 1:10 de la $LC_{50} - 48$ hs para *Daphnia magna* hubo una reducción a corto plazo de la abundancia y número de especies SPEAR y un aumento de SPEnotAR. A concentraciones de 1:100 se observó un cambio a largo plazo de la composición del ensamble. Schäfer et al. (2007) asociaron el estrés causado por la exposición a los biocidas con una disminución en la abundancia relativa y número de especies del ensamble de invertebrados en Francia. Leonard et al. (1997) estudiaron el efecto de las aplicaciones de endosulfan en el Río Namoi (Australia) al atravesar una región cultivada con algodón, registrando disminución en la densidad de 6 taxones de macroinvertebrados. Beketov et al. (2013) mostraron que en Alemania y Francia la exposición a biocidas produjo una reducción regional de diversidad taxonómica a nivel de familia en cuencas rurales. La reducción de la diversidad taxonómica a nivel de familia fue observada aún a concentraciones menores que las RTL (Regulatory Threshold Level) legalmente aceptables.

Otras investigaciones también vincularon los cambios en la composición del ensamble de invertebrados con la contaminación por agrotóxicos. Castillo et al. (2006) evaluaron el efecto de los biocidas en arroyos que drenan plantaciones de bananos en Puerto Rico usando la composición de macroinvertebrados como indicador de contaminación. Observaron que todos los sitios adyacentes a las plantaciones mostraron cambios significativos en la composición comparados con arroyos sin cultivos en las márgenes. Egler et al. (2012) evaluaron la influencia de distintos usos del suelo sobre el ensamble de macroinvertebrados en Brasil; registrando una disminución de la riqueza en los sitios agrícolas.

En nuestro país existen referencias bibliográficas de trabajos sobre la distribución y abundancia de macroinvertebrados en ambientes con procesos de contaminación de origen múltiple. Miserendino estudió las comunidades de macroinvertebrados en ríos y arroyos de montaña de Patagonia afectados por urbanización (Miserendino et al. 2008; Miserendino et al. 2010), como así también por distintos tipos de hábitats (Velasquez & Miserendino 2003) y con diferentes usos del suelo (Miserendino & Pizzolon 2004; Miserendino 2009; Brand & Miserendino 2011). Domínguez & Fernández (1998) determinaron el estado de los ríos de Tucumán en base a su fauna bentónica. Gualdoni et al. (2011) evaluaron el estado ecológico de arroyos serranos de Córdoba que atraviesan sectores de recreación turística. Pavé & Marchese (2005), estudiaron la incidencia de los efluentes industriales y cloacales sobre la

estructura del bentos en Entre Ríos. Scheibler (2008) evaluó la composición faunística de la comunidad de invertebrados de zonas áridas en Mendoza según características propias del ambiente. Rodrigues Capítulo estudió las comunidades bentónicas de arroyos y ríos de distintas áreas de la región Pampeana afectados principalmente por efluentes urbanos e industriales (Rodrigues Capítulo et al. 2003, 2001; Gómez et al. 2008; Ocón et al. 2004), como así también por el efecto de enriquecimiento de nutrientes (Cortezzi et al. 2015) y relacionadas con características del hábitat (Rodrigues Capítulo et al. 2002).

La presencia agrotóxicos en la región Pampeana ha sido registrada en diversas investigaciones. Marino y Ronco (2005) detectaron biocidas en ríos que atraviesan la principal área agrícola en La Pampa, Argentina. Jergentz et al. (2005) y Mugni et al. (2011) detectaron biocidas en el agua, sólidos suspendidos y sedimentos de fondo en arroyos de primer orden que pasan a través de parcelas cultivadas. Aparicio et al. (2013), De Gerónimo et al. (2014) y Lupi et al. (2015) detectaron la presencia de biocida y sus productos de degradación en aguas superficiales y en suelo de cuencas agrícolas de la Provincia de Buenos Aires. Hunt et al. (2016) registraron la concentración de biocidas en sedimentos de arroyos de Paraguay, Brasil y Argentina, en la región Pampeana. Las referidas publicaciones informan concentraciones de plaguicidas. La relación eventual entre la toxicidad de agroquímicos y la composición de los ensambles de macroinvertebrados acuáticos de cuencas rurales de nuestra región ha recibido menor atención (Jergentz et al. (2004 a)). La información disponible respecto del efecto de la aplicación de agrotóxicos sobre los macroinvertebrados en Europa contrasta con las escasas referencias editas en nuestro medio y no sustituye la necesidad de investigar el tema en los ambientes regionales de la Pampa Argentina, entre otros motivos porque la fauna es diferente, como así también los cultivos, los agroquímicos más comúnmente empleados y las normativas de manejo y control.

El presente trabajo de tesis se centra en el impacto producido por los agroquímicos en los sistemas acuáticos. Se estudió el efecto de la aplicación de los agroquímicos sobre la estructura del ensamble de macroinvertebrados acuáticos residentes de arroyos Pampeanos. Además se determinaron las LC_{50} de varios agrotóxicos utilizados en la zona de estudio y se llevaron a cabo experimentos de laboratorio durante los cuales se reprodujeron condiciones similares a las ocurridas durante los eventos de escorrentía, donde los organismos fueron expuestos a distintas concentraciones de biocidas del mismo orden de magnitud que las registradas in situ.

Biocidas de uso más común en nuestra región...

Glifosato

El glifosato representa el 65 % del total de agrotóxicos utilizados en la Argentina (Aparicio et al. 2015). El glifosato (N-(fosfometil) glicina / CAS 1071-83-6) ácido y sus sales es el herbicida más utilizado en soja y también es utilizado en otros cultivos como el maíz y algodón (CASAFE 2012). Es considerado como probablemente carcinogénico por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (IARC 2015). El glifosato puede ser moderadamente tóxico para invertebrados acuáticos con dosis letales comprendidas en un extenso rango de variación, desde 10 hasta 1.000 mg/l (PAN 2011). La toxicidad del producto comercial varía de acuerdo a los coadyuvantes que se incorporan en su formulación. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis del ácido shiquímico; precursor de la síntesis de aminoácidos aromáticos en plantas y microorganismos (Demetrio 2012).

Este herbicida se utiliza en distintas oportunidades durante el ciclo de cultivo, generalmente antes de la siembra para generar un barbecho químico, así como en la pre y post emergencia. En Argentina es aplicado en dosis de 1,6 – 4 litros por hectárea, 2 a 3 veces por período de crecimiento. Repetidas aplicaciones en el campo pueden representar un riesgo para aguas superficiales adyacentes a los cultivos, su persistencia en el suelo es moderada, con una vida media de 32 días, con datos de campo que varían entre 1 y 197 días (Giesy et al. 2000). La degradación por microorganismos es la vía primaria de disipación en el ambiente. Por ello se estima una vida media de entre 7 a 14 días en el agua (Giesy et al. 2000).

Cipermetrina

El consumo de biocidas, en su conjunto, excluyendo el glifosato, representa el 6 % del total de agrotóxicos utilizados en Argentina (Aparicio et al. 2015). La cipermetrina ((R, S)-alfa-ciano-3-fenoxibenzil (1RS)-cis, trans-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano -carboxilato/ CAS 52315-07-8) es un biocida sintético de la familia de los piretroides. La OMS ha considerado altamente y moderadamente peligroso los isómeros, mientras que la USEPA no ha tenido un consenso de acuerdo a la categoría de toxicidad de ninguno de ellos (Kegley et al. 2011). Es altamente tóxico para invertebrados acuáticos, como micro-crustáceos de agua dulce con concentraciones

letales en algunos casos menores a 0,1 µg/l (PAN 2011). Los piretroides se caracterizan por producir una apertura prolongada de los canales de sodio neuronales, resultando en una transmisión continua del impulso nervioso (Demetrio 2012).

Generalmente se aplica en el cultivo antes de la floración de la soja o ante la aparición de plagas puntuales. Tiene una vida media, que varía de 8 a 16 días, siendo susceptible a la fotodegradación (Demetrio 2012).

Clorpirifos

El clorpirifos (O, O-dietil O-(3, 5,6-tricloro-2-piridil) fosforotioato/CAS 2921-88-2) es un biocida organofosforado, clasificado como moderadamente peligroso por la OMS y moderadamente tóxico por USEPA (Kegley et al. 2011), de amplio uso como biocida. Para los invertebrados acuáticos se considera altamente tóxico o muy altamente tóxico con concentraciones letales en algunos casos menores a 0,1 mg/l (PAN 2011). Inhibe la actividad de la acetilcolinesterasa, enzima implicada en la sinapsis nerviosa y en la neurotransmisión muscular, produciendo efectos neurotóxicos. La acetilcolinesterasa causa hiperactividad que provoca espasmos musculares involuntarios que puede desencadenar parálisis y muerte (Demetrio 2012).

Se utiliza antes de la floración o cuando se empiezan a ver los daños en el cultivo. Presenta una vida media de 30 días en suelos y 18-20 días en aguas (Mazanti et al. 2003).

Endosulfan

El endosulfan (6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahidro-6,9-metano-2,4,3-benzodioxatiepina-3-oxido/CAS 115-29-7) es un biocida perteneciente al grupo de los organoclorados, clasificado como moderadamente peligroso por la OMS y altamente tóxico por USEPA (Kegley et al. 2011). Ha sido prohibido en más de 50 países, que incluyen la Unión Europea y varias naciones de Asia y África occidental. A causa de su alta toxicidad y su alto potencial de bioacumulación y contaminación, en la V Reunión de las Partes del Convenio de Estocolmo sobre los Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs), se aceptó la inclusión del endosulfán en el anexo A, promoviendo la prohibición de su uso en todo el mundo. Argentina legisló el uso del endosulfán prohibiendo la importación del principio activo y sus formulados (Julio 2012) y su elaboración y uso (Julio 2013). Es un disruptor endócrino que causa efectos adversos en los organismos y su progenie. Bloquean las señales hormonales afectando las acciones

endocrinas. Sus efectos se asocian con cambios en la conducta, aprendizaje, glándulas tiroideas, problemas de fertilidad y cánceres glandulares (Demetrio 2012).

Endosulfan tiene una vida media mayor que cipermetrina y clorpirifos (Leonard et al. 2000). La vida media del α , β y endosulfan sulfato en suelos, bajo condiciones aeróbicas, es de 28, 157 y 1336 días respectivamente (GFEA-U 2007; USEPA 2007 a). El Endosulfan se descompone a endosulfan sulfato que es más persistente y tan tóxico como su compuesto de origen. Ambos isómeros y el endosulfan sulfato son más persistentes cuando son absorbidos en el sedimento (GFEA-U 2007; USEPA 2007 a).

HIPÓTESIS

La hipótesis que se plantea hace referencia a que la utilización de agroquímicos en la agricultura produce un impacto en los cursos de agua superficiales adyacentes a las áreas de aplicación cuyas características e intensidad serán evaluadas.

Se propone como hipótesis que la aplicación de biocidas en los cultivos producirá la disminución de la abundancia y riqueza taxonómica de los macroinvertebrados acuáticos por pérdida de los organismos más sensibles. Asimismo, se plantea como hipótesis que la aplicación de fertilizantes en cuencas con uso intensivo del suelo producirá el aumento de la concentración de nutrientes en los arroyos adyacentes.

Se sugiere que el efecto de reiterados pulsos de toxicidad influye en la composición del ensamble.

OBJETIVOS

El objetivo general del presente plan de trabajo es evaluar el impacto ambiental producido por la agricultura intensiva sobre los cursos de agua a través del estudio comparativo de la concentración de nutrientes y biocidas y su efecto en la composición de los ensambles de macroinvertebrados acuáticos representativos de las comunidades regionales de los arroyos pampeanos.

Con la finalidad de validar el objetivo general se proponen objetivos específicos que se desarrollaran en el campo y en el laboratorio:

✓ Comparar la concentración de nutrientes y biocidas en arroyos de cuencas con uso contrastante del suelo: agrícola, ganadero y una reserva natural.

✓ Comparar la abundancia y composición taxonómica de los ensambles de macroinvertebrados en los arroyos seleccionados.

✓ Determinar la toxicidad aguda (LC_{50}) de los agrotóxicos más utilizados en nuestra región para el anfípodo *Hyaella curvispina*.

✓ Desarrollar experimentos de laboratorio donde se estudie el efecto de exposiciones breves, subletales, de agroquímicos para *H. curvispina* simulando escenarios de exposición ambientalmente realistas y evaluando puntos finales de eventual implicancia para la población (mortalidad posterior a la exposición, crecimiento, reproducción).

✓ Se propondrán normas de manejo tendientes a atenuar los eventuales aspectos negativos.

II

Estudio de campo

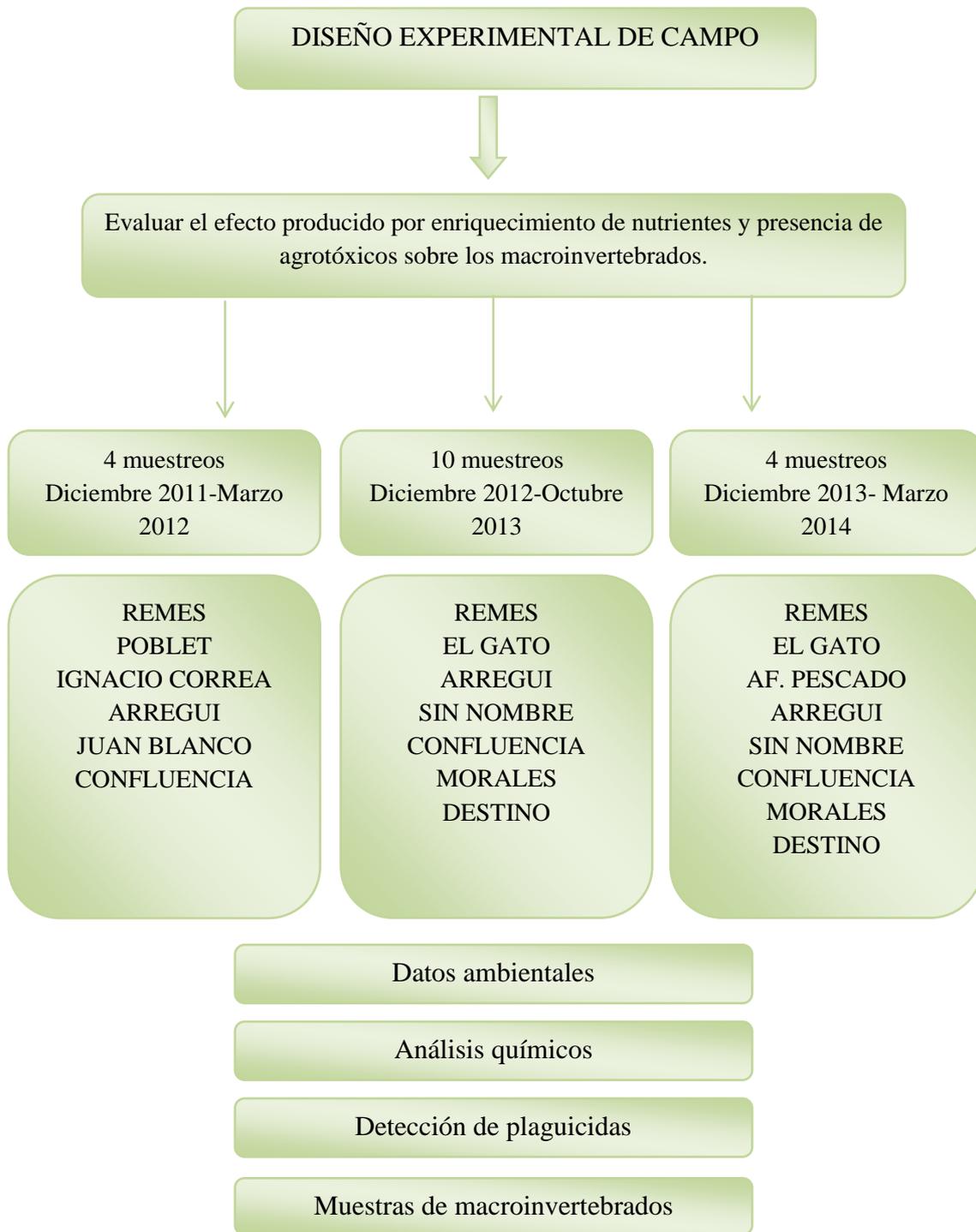


Figura 1. Diagrama del diseño muestral desarrollado con la finalidad de validar los objetivos propuestos durante el estudio de campo. Se muestran los 3 períodos de muestreo con los respectivos sitios que fueron estudiados y los materiales que fueron analizados.

ÁREA DE ESTUDIO

El área de estudio se sitúa en la Provincia de Buenos Aires, corresponde al grupo de tributarios del Río de La Plata (Frenguelli 1956), entre la ciudad de La Plata y la localidad de Punta Indio (Figura 1.1). Comprende una serie de cuencas que corren en sentido Oeste – Este hacia el Río de la Plata. Los sitios estudiados se hayan ubicados en zonas con distintos usos del suelo. El área más cercana a la ciudad de La Plata corresponde a una zona de agricultura intensiva y cultivos bajo cubierta. Alejándose de La Plata hacia Magdalena se encuentra una zona de ganadería. Hacia el sur, entre Magdalena y Punta Indio, se localiza la reserva de la biosfera Parque Costero Sur (Athor 2009).

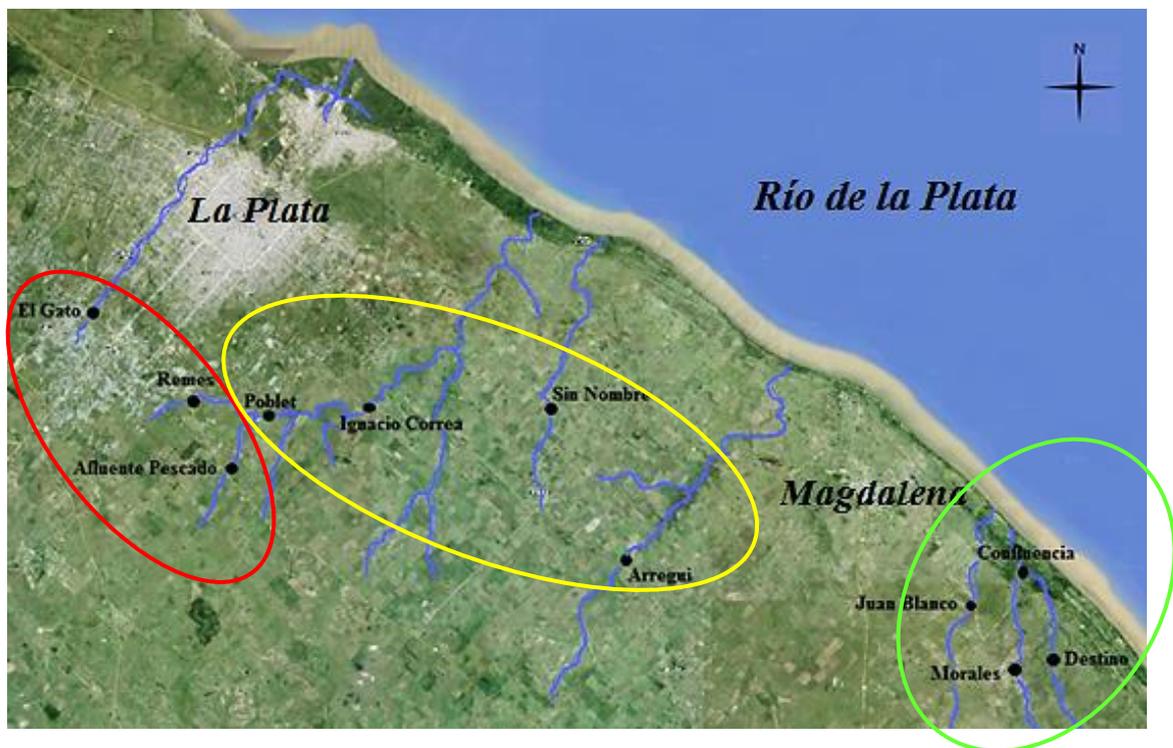


Figura 1.1. Sitios de muestreo. En rojo se señalan los sitios ubicados en zonas con agricultura, en amarillo sitios ganaderos y en verde los sitios ubicados en la reserva.

La región posee un clima templado húmedo, con una precipitación media anual de 1060 mm (Hurtado et al. 2006). Las temperaturas medias mensuales oscilan entre 9.9 °C en julio a 22.4 °C en enero. Los arroyos estudiados se desarrollan en un ambiente llano, donde se reconocen desde el punto de vista geomorfológico dos sectores: la Zona Interior entre los 5 y 25 m s. n. m. y la Planicie Costera que se extiende por debajo de

los 3 m s. n. m. Hidrogeológicamente comprende un nivel superior denominado Pampeano, integrado por limos, arenas y arcillas, presentando frecuentemente concreciones o bancos de carbonato de calcio. Este nivel incluye la capa freática. Por debajo del Pampeano se sitúan las Arenas Puelches que representa al acuífero más importante del Noreste de la Provincia de Buenos Aires. Se trata de una secuencia de arenas cuarzosas finas a medianas. Estas unidades se encuentran separadas por sedimentos de menor permeabilidad que conforman un acuífero multiunitario (Bazán et al. 2011).

La cuenca del arroyo El Pescado, es la más intensamente cultivada. Tradicionalmente esta cuenca presentaba un uso del suelo ganadero sobre pasturas naturales, tendencia que durante las últimas décadas fue cambiando hacia el reemplazo progresivo por el cultivo de soja (Mugni 2009). El arroyo Pescado es el curso de agua de mayor importancia de la Franja costera del Río de la Plata. Tiene su nacimiento en el partido de La Plata, entre Olmos y Etcheverry y entre las rutas provinciales 215 y 36. Ocupa una superficie aproximada de 625 km². Como accidente geográfico se lo puede caracterizar como un típico arroyo de llanura con una planicie de inundación; tiene un curso sinuoso que atraviesa pastizales, cañadas y bañados. Su ambiente se podría caracterizar en términos generales como de pampa deprimida, con suelos alcalinos de tipo plano o plano cóncavo y que presentan un nivel freático elevado, con pasturas naturales (Hurtado et al. 2006). En su cuenca se ubicaron 4 de los sitios de muestreo.

✓ Remes (Re) (35° 1' 31,87'' S; 57° 59' 39,6'' W), ubicado cercano a la nacimiento, en un área donde se desarrolla agricultura intensiva. En la intersección con la ruta 36 el arroyo atraviesa una explotación agropecuaria de 110 ha, dividida en dos parcelas por el cauce, donde se hace agricultura, con rotación de cultivos (maíz, soja y trigo/soja). Aguas arriba de esta explotación se hacen cultivos de huerta (Figura 1.2). Los cultivos se extienden hasta unos pocos metros del arroyo.

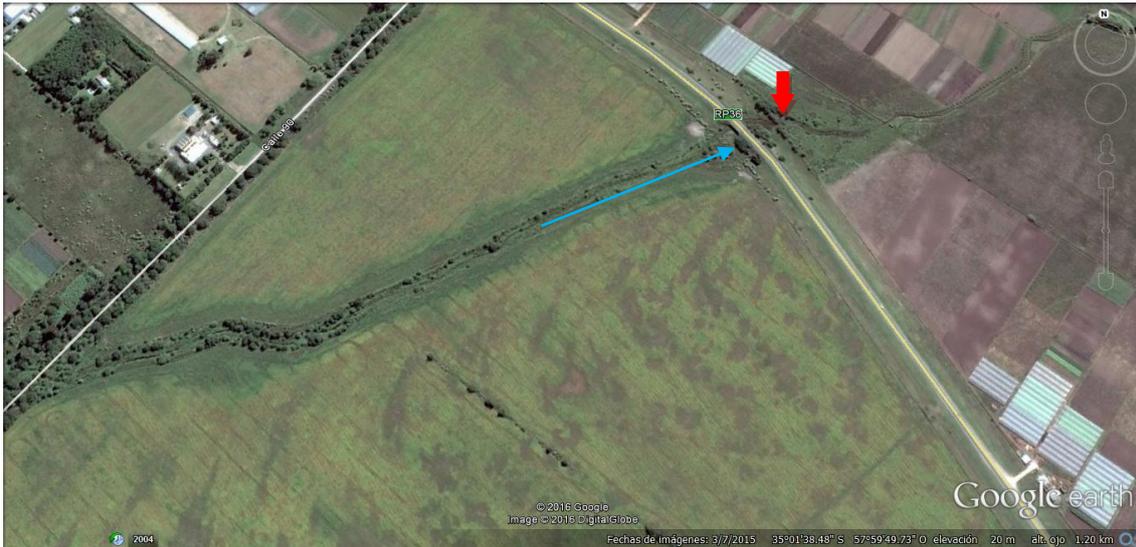


Figura 1.2. Arroyo Pescado, sitio de muestreo Remes (flecha roja), rodeado de cultivos. La flecha azul muestra la dirección de corriente del agua del arroyo. (Lisa Hunt 2011)

✓ Poblet (Po) ($35^{\circ} 2' 2.45''$ S; $57^{\circ} 56' 34.3''$ W), aproximadamente 3.8 km aguas abajo de Remes, en la región media de la cuenca, representa una zona típicamente ganadera. El período en que se tomaron las muestras correspondió a un período seco. La densidad del ganado en las márgenes del arroyo fue elevada y las márgenes no estaban alambradas; por lo que el arroyo representaba la única fuente de agua para el ganado. Este sitio en lo sucesivo será denominado de ganadería intensiva (Figura 1.3).



Figura 1.3. Arroyo Pescado, sitio de muestreo Poblet (Lisa Hunt 2011).

✓ Ignacio Correa (IC) ($35^{\circ} 1'23.97''S$; $57^{\circ}51'27.42''W$), 8 km aguas abajo de Poblet presentaba ganadería sobre pasturas naturales, con menor carga animal. Las márgenes del arroyo estaban alambradas, dejando una franja de 5-20 m cubiertas de pasturas naturales, libres de ganado. Éste sitio en lo sucesivo será denominado de ganadería extensiva (Figura 1.4).



Figura 1.4. Arroyo Pescado, sitio de muestreo Ignacio Correa (Lisa Hunt 2011)

✓ Afluente Pescado (AP) ($35^{\circ}3'13,08''S$; $57^{\circ}58'35,34''W$), ubicado cercano a la nacientes en un área donde se desarrolla agricultura intensiva. El cauce del arroyo fue rectificadado y profundizado seguramente para facilitar el drenaje de los bajos adyacentes. Durante el período de estudio el productor dejó una franja sin cultivar, cubierta por pasturas, entre el cultivo y las márgenes del arroyo (Figura 1.5).



Figura 1.5. Sitio Afluente Pescado (flecha roja), se observa una franja sin cultivar entre los cultivos y el arroyo (flechas amarillas). Obsérvese el cauce rectificadado que en la imagen aparece como un camino (Marina Solis 2013)

El arroyo El Gato (Ga) ($34^{\circ} 58' 53,8 ''S$; $58^{\circ} 3' 12,1 ''W$), se encuentra situado en la parte superior de la cuenca, zona rural hortícola y de cultivos bajo cubierta (Figura

1.6). Se extiende por una distancia de 15 km en dirección NE - SE. Al llegar a la planicie costera fue canalizado para que sus aguas desemboquen en el Río Santiago (Hurtado et al. 2006).

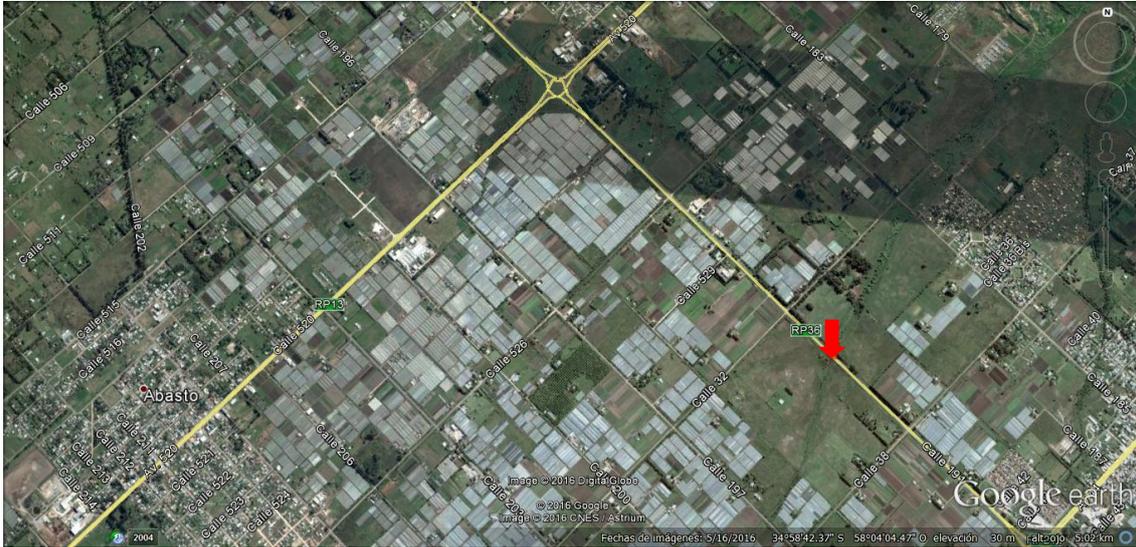


Figura 1.6. Arroyo El Gato (flecha) (Marina Solis 2013).

El arroyo Arregui ($35^{\circ} 7' 22,1'' S$; $57^{\circ} 41' 11,6'' W$), se encuentra ubicado en una cuenca dedicada principalmente a la ganadería sobre pasturas naturales. Presenta una longitud aproximada de 32 km y una cuenca de 115 km^2 , con profundidades que van desde los 0,4 a 2 m, anchos entre los 4 y 15 m. Las parcelas adyacentes al arroyo contaban con un alambrado que evitaba el ingreso del ganado. La distancia entre el

alambrado y las márgenes del arroyo era de 5-20 m cubiertos por pasturas. Este arroyo será referido en adelante como de ganadería extensiva (Figura 1.7).



Figura 1.7. Sitio de muestreo Arregui (Marina Solis 2013).

El Arroyo Sin Nombre (SN) ($35^{\circ} 2' 22,8''S$; $57^{\circ} 42' 40,5''W$) es un afluente del arroyo Zapata, drena una cuenca donde el uso del suelo dominante es la ganadería extensiva. El arroyo atraviesa una parcela donde el ganado accede libremente al arroyo para beber (Figura 1.8).



Figura 1.8. Sitio de muestreo Sin Nombre (Marina Solis 2013).

Los arroyos Juan Blanco (JB) ($35^{\circ} 8'30.23''\text{S}$; $57^{\circ}26'23.98''\text{W}$) (Figura 1.9), Confluencia (Co) ($35^{\circ} 7' 53,10''\text{S}$; $57^{\circ} 24' 1,47''\text{W}$) (Figura 1.10), Destino (De) ($35^{\circ} 8' 15,35''\text{S}$; $57^{\circ} 23' 40,21''\text{W}$) (Figura 1.11) y Morales (Mo) ($35^{\circ} 8' 17,54''\text{S}$; $57^{\circ} 23'' 57,74''\text{W}$) (Figura 1.12) se encuentran ubicados en el Parque Costero Sur, declarado Reserva de Biosfera Natural y Cultural por la Unesco en 1984 (Athor 2009). Si bien es un área protegida, en los sitios Juan Blanco, Destino y Morales se observó ocasionalmente la presencia de ganado en las márgenes. No obstante, estos sitios presentan el menor grado de impacto antrópico de la región. El arroyo Juan Blanco cuenta con un largo total aproximado de 29 km y una cuenca de 115 km^2 , su ancho oscila entre 2 y 16 metros y su profundidad entre 0,5 y 2,5 metros. Confluencia presenta un largo aproximado hasta su desembocadura de 25 km y una cuenca con una superficie aproximada de 197 km^2 , variando su profundidad entre 0,3 y 2 metros y su ancho entre 2 y 9 metros.



Figura 1.9. Sitio de muestreo Juan Blanco (Lisa Hunt 2011)



Figura 1.10. Sitio de muestreo Confluencia (Marina Solis 2013).



Figura 1.11. Sitio de muestreo Destino (Marina Solis 2013).



Figura 1.12. Sitio de muestreo Morales (Marina Solis 2013).

Cada sitio presentó una vegetación acuática característica. Remes (Figura 1.13) y Sin Nombre (Figura 1.14) presentaron mayor vegetación acuática, que generalmente cubría por completo la superficie del arroyo. Remes registró dominancia de *Typha dominguensis* y *Ludwigia peploides*. En Sin Nombre la vegetación fue similar, observándose también una superficie cubierta totalmente por *L. peploides*, acompañada por *Sagittaria montevidensis* y *Gymnocoronis spinlanthoides*. En Morales (Figura 1.15) y Destino (Figura 1.16) también se registró una importante cobertura de macrófitas que cubría por lo general toda la superficie. En Destino predominaron *L. peploides* y *Myriophyllum aquaticum*, acompañadas por *Hydrochleis nymphoides*, mientras que en Morales la dominancia correspondió a *Azolla filiculoides* y *M. aquaticum*. Ignacio Correa (Figura 1.17), Poblet (Figura 1.18), Juan Blanco (Figura 1.19) y Arregui (Figura 1.21) presentaron la menor cobertura de los sitios estudiados con dominancia de *Schoenoplectus californicus*. En Ignacio Correa se encontraba acompañada por *Eichhonia crassipes* y *Pistia stratiotes* y en Juan Blanco con *G. spilanthoides*. La vegetación solo se localizaba en las márgenes de los arroyos cubriendo una fracción minoritaria de la superficie. Confluencia (Figura 1.20) y Arregui (Figura 1.21) estuvieron representados casi exclusivamente por la presencia en de *S. californicus*. En confluencia *S. californicus* estuvo acompañada principalmente por *L. peploides* y *A. filiculoides*. En ocasiones en Arregui también se observó la presencia de *A. filiculoides*, *Elodea* y algas mucilaginosas. La vegetación se encontraba distribuía por todo el arroyo. Afluente Pescado (Figura 1.22) solo en algunas ocasiones registró cobertura vegetal

cubriendo parcialmente el arroyo, compuesta mayoritariamente de *G. spinlantoides*. En el Gato (Figura 1.23), *T. dominguensis* se vio acompañado por abundante *L. peploides* observándose ocasionalmente, la presencia de matas algales.

En los meses de Diciembre y Enero los arroyos presentaron una vegetación mucho más conspicua. Fue característico el gran desarrollo de *L. peploides*, *G. spilanthoides* y *M. aquaticum*.



Figura 1.13. Vegetación de Remes (Marina Solis 2013).



Figura 1.14. Vegetación de sin Nombre (Marina Solis 2013).



Figura 1.15. Vegetación de Morales (Marina Solis 2013).



Figura 1.16. Vegetación de Destino (Marina Solis 2013).



Figura 1.17. Vegetación de Ignacio Correa (Marina Solis 2013).



Figura 1.18. Vegetación de Poblet (Marina Solis 2011).



Figura 1.19. Vegetación de Juan Blanco (Marina Solis 2011).



Figura 1.20. Vegetación de Confluencia (Marina Solis 2013).



Figura 1.21. Vegetación de Arregui (Marina Solis 2013)



Figura 1.22. Vegetación de Afluente Pescado (Marina Solis 2014).



Figura 1.23. Vegetación del Gato (Marina Solis 2013).

MATERIALES Y MÉTODOS

Datos ambientales

En cada muestreo se hicieron determinaciones *in situ*. El ancho y profundidad de los cauces se midieron por medio de una cinta métrica graduada. Temperatura del agua (T°C), conductividad, pH, turbidez y oxígeno disuelto (OD) se midieron con un multiparámetro (modelo Yellow Springs instruments si 556). Las precipitaciones fueron registradas en la Estación Experimental de La Facultad de Agronomía de La Universidad Nacional de La Plata, localizada a 8 Km del Suroeste de la ciudad de La Plata, Buenos Aires (35°01´S, 57°59´W).

Se tomaron muestras de agua para determinar los sólidos suspendidos (SS) en el laboratorio, por diferencia de peso después de filtrar un volumen de agua a través de filtros Whatman GF/C. Los filtros fueron muflados a 550 °C por dos horas con anterioridad a su utilización (APHA 2005).

Análisis químicos

Nutrientes

En cada relevamiento se tomaron muestras de agua de los arroyos que fueron llevadas en frío al laboratorio para su análisis. Las muestras de agua fueron filtradas a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C. La concentración de nutrientes disueltos se midió siguiendo la metodología propuesta por APHA (1995). La concentración de fósforo reactivo soluble (PRS) se determinó mediante la reacción con molibdato-ascórbico, las de nitrito (N-NO₂⁻) por diazonización, nitrato (N-NO₃⁻) por reducción con hidracina seguida de diazotización y las de amonio (N-NH⁺⁴) por la reacción del indofenol azul.

Clorofila

Muestras de agua para la determinación de clorofila en el laboratorio fueron tomadas durante los muestreos. El agua fue filtrada a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C. Los filtros se secaron, trituraron con mortero en acetona 90% y se dejaron en heladera y oscuridad 24 hs. Luego, se centrifugó y trasvasó la extracción a celdas para medir sus absorbancias a 750 y 665 NM. Se agregó HCL 4N y se repitió la

lectura a las mismas longitudes de onda. Los cálculos se efectuaron como se indica en Lorenzen (1967).

Análisis de biocidas

En cada muestreo se tomaron muestras de sedimento de fondo por medio de muestreadores cilíndricos tipo “corer” de 4,5 centímetros de diámetros. Estas muestras fueron llevadas en frío al laboratorio, donde se mantuvieron refrigeradas hasta su extracción. Los sedimentos se extrajeron con una mezcla de acetona y cloruro de metileno (You et al. 2004 b). El *clean up* se llevó a cabo mediante la extracción en fase sólida (SPE) (USEPA 2007).

Durante el primer período las determinaciones de los biocidas se llevaron a cabo en la Universidad del Sur de Illinois, USA por cromatografía gaseosa con detector de microcaptura de electrones y fueron descritas en detalle por Hunt et al. 2016. Los análisis se realizaron en un Agilent 6890 series GC, equipado con un inyector automático Agilent 7683 y un micro ECD (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Las determinaciones del segundo y tercer período se llevaron a cabo por el laboratorio GEMA. Los extractos de la muestra se inyectaron en una GC-ECD (Thermo Scientific 1300), equipado con una columna HP5, 30 m y 0,32 ID, portador N₂, las temperaturas en la rampa y el detector fue: 100°C (3 min), 15°C / min a 300°C, durante 3 min.

Todos los solventes citados anteriormente fueron J. T. Baker. Las normas utilizadas para la calibración fueron de Accustandard mixto organoclorados y biocidas organofosforados (EPA-8081-A 1996).

Muestras del ensamble de Macroinvertebrados

Las muestras de macroinvertebrados acuáticos se colectaron en la vegetación emergente por medio de una red de mano tipo D-net de 30 cm de diámetro y 500 µm de abertura de malla (Figura 1.24) (Domínguez & Fernández 1998, 2009). Por cada sitio de muestreo, se tomaron tres réplicas en cada uno de los relevamientos realizados.



Figura 1.24. Red de mano tipo D-net (Marina Solis 2013).

En cada sitio se obtuvieron muestras con similar esfuerzo de muestreo abarcando un área de 1 m² para cada una de las muestras (Figura 1.25) (Domínguez & Fernández 1998, 2009). Las muestras recolectadas se pasaron por un tamiz para eliminar el agua excedente y luego se colocaron en bolsas plásticas debidamente rotuladas (especificando fecha, sitio y número de réplica) con alcohol 70% y eritrosina B para su posterior separación, identificación y conteo (Figura 1.26).



Figura 1.25. Área de muestreo. (Marina Solis 2013).



Figura 1.26. Toma de muestra. (Marina Solis 2013).

En el laboratorio, las muestras fueron tamizadas (tamiz de 500 μm) y colocadas en bandejas, donde se separaron los organismos presentes con la ayuda de pinzas. El sustrato fue removido cuidadosamente hasta asegurarse de que no queden organismos en él. Luego los macroinvertebrados fueron identificados bajo microscopio óptico estereoscópico (lupa) mediante el uso de las claves taxonómicas Domínguez & Fernández (2009) y Merritt & Cummins (2008), como mínimo hasta el nivel taxonómico de familia. Lenat & Barbour (1994) sugieren que el nivel taxonómico de familia permite una adecuada caracterización de la calidad ecológica en los sistemas fluviales. Si bien para la determinación taxonómica se puso especial énfasis en lograr la mayor precisión posible a través de la consulta con especialistas, en la mayoría de los casos fue imposible realizar determinaciones a nivel específico. Por lo tanto se tomó en cuenta a la unidad taxonómica como la identificación taxonómica hasta el nivel más bajo determinado: filo u orden, familia, género, especie o morfoespecie. Luego de la identificación las muestras fueron conservadas en tubos debidamente rotulados en alcohol 70% (Figura 1.27).



Figura 1.27. Materiales de laboratorio para el procesamiento de las muestras (Marina Solis 2013).

Análisis estadístico

Los parámetros ambientales entre los distintos sitios estudiados fueron comparados mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Previo al análisis se probaron los supuestos estadísticos de homogeneidad de la varianza y normalidad. En los casos en que los supuestos no se cumplieron se aplicó el método de Kruskal Wallis (ANOVA no paramétrico por rangos). Cuando se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) se procedió con la comparación de medias para determinar diferencias por el método de comparación múltiple entre medias. Las correlaciones entre las variables físicas y químicas fueron relacionadas mediante el coeficiente de correlación del producto-momento de Pearson, asumiendo en todos los casos un nivel de significancia $p < 0,05$. En relación a los parámetro ambientales del tercer período estos fueron comparados agrupándolos según el uso del suelo (agrícola, ganadero, reserva) mediante el análisis de la varianza (ANOVA) como fue explicado anteriormente.

La estructura del ensamble fue analizada utilizando métricas que incluyen medidas de composición, riqueza y porcentajes y abundancias de los principales grupos

de macroinvertebrados. La abundancia total (N), fue determinada por el número total de individuos de cada taxón y expresada como el número de individuos por unidad de superficie (ind.m^{-2}) y la riqueza taxonómica (S) fue determinada por el número total de taxones. La abundancia y riqueza fueron calculadas usando el programa estadístico PRIMER versión 5. Para comparar la abundancia y riqueza entre los distintos sitios se utilizó el análisis de varianza (ANOVA).

Los patrones del ensamble de macroinvertebrados fueron analizados por medio de técnicas multivariadas utilizando el programa PRIMER versión 5 (Clarke & Gorley 2001). Con el fin de reducir la contribución de los taxones abundantes previamente los datos fueron transformados a $\log(x+1)$. Se utilizó el índice de similaridad de Bray Curtis. Se realizó un análisis Clúster con los datos de abundancia de cada sitio, donde se pudieron visualizar los patrones del ensamble. Se aplicó el método por promedio de pares de grupos (Clarke & Warwick 2001).

Para testear si existían diferencias significativas entre los distintos sitios se utilizó el análisis de similaridad ANOSIM. Se calculó el porcentaje de similitud (SIMPER) para determinar los taxones que más contribuyeron a las diferencias de los ensambles de macroinvertebrados entre los distintos sitios (Clarke & Warwick 2001).

Se realizaron análisis particulares para el segundo período: con el objeto de ver si existieron diferencias significativas en las abundancias de taxones de cada sitio después del evento de lluvia excepcional (273 mm) del 2/4/2013 se realizó un test de comparación no paramétrico de pares de muestras (Wilcoxon test). El nivel de significancia usado fue $p < 0,05$. Se construyeron diagramas de Olmstead – Tukey para jerarquizar la dominancia de taxones (Sokal & Rohlf 1979). Se determinaron los taxones dominantes, constantes, ocasionales y raros a partir de la relación entre las densidades de los organismos y sus frecuencias de aparición. Los límites entre ellos se determinaron en base a la media de la frecuencia de aparición relativa para el eje de las “X” y de la media respectiva del logaritmo natural de la sumatoria de la densidad absoluta para el eje de las “Y”, estableciendo así cuatro cuadrantes. Se consideraron taxones dominantes, aquellos que presentaron la mayor densidad y frecuencia medias. Las constantes presentaron densidades menores a la media y la frecuencia mayor a la media. Las ocasionales fueron las que presentaron densidad mayor a la media y frecuencia menor a la media. Las raras presentaron densidades y frecuencias menores a ambas medias.

PRIMERA ETAPA

RESULTADOS

En los 4 muestreos realizados entre Diciembre 2011 - Marzo 2012, se muestrearon los sitios, Remes, Poblet, Ignacio Correa, Arregui, Juan Blanco y Confluencia. En Enero 2012 los arroyos Juan Blanco y Confluencia no fueron muestreados porque se encontraban secos (Figura 1.28).

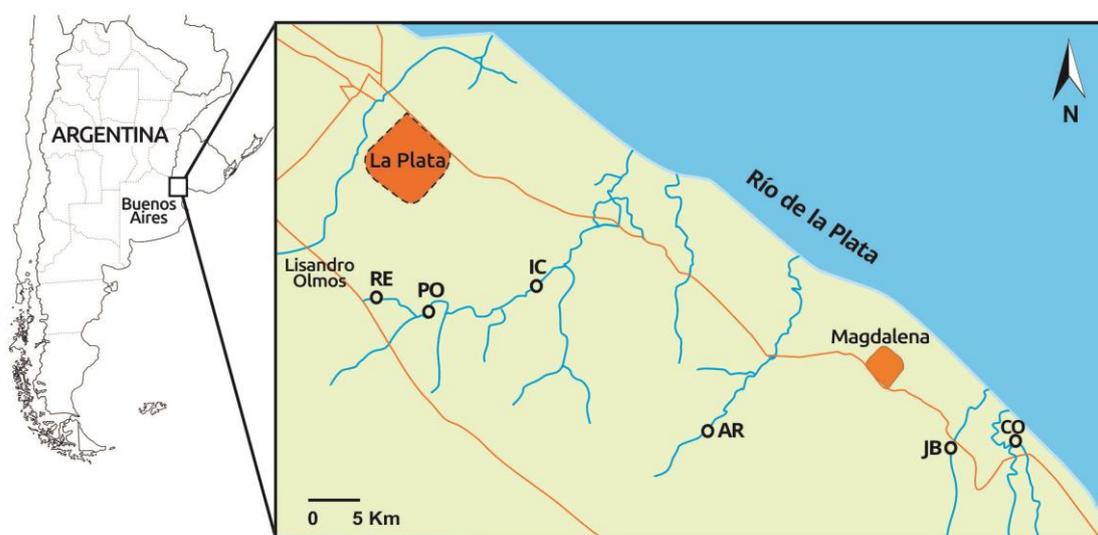


Figura 1.28. Sitios muestreados durante la primera etapa. RE: Remes, PO: Poblet, IC: Ignacio Correa, AR: Arregui, JB: Juan Blanco, CO: Confluencia.

Parámetros físicos y químicos

Los valores de pH y conductividad entre los distintos arroyos no registraron diferencias significativas. Los valores medios de pH de cada arroyo variaron entre neutro (7,1 Remes) y alcalino (7,9, Juan Blanco). La conductividad presentó un amplio rango de variación. La mayor conductividad se registró en Arregui (813 $\mu\text{S}/\text{cm}$) y la menor en Ignacio Correa (195 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Los sólidos suspendidos variaron entre los distintos sitios de muestreo: Remes 18 (4-34), Poblet 123(34-289), Ignacio Correa 30 (8-51), Arregui 14(10-20), Juan Blanco 210 (29-278) y Confluencia 12 (6-17) (Tabla 1.1).

Las concentraciones de nutrientes registraron diferencias significativas entre los sitios. Las concentraciones medias de PRS fueron significativamente mayores en los 3 sitios de la cuenca del arroyo El Pescado, con agricultura en la cuenca superior, comparado con Arregui, Juan Blanco y Confluencia (ANOVA, Tukey $p < 0,001$). Se determinaron diferencias significativas en las concentraciones de $N-NO_2^-$, observándose una concentración media mayor en Poblet (20 $\mu\text{g/l}$) con respecto a Arregui (10 $\mu\text{g/l}$) (ANOVA, Tukey $p < 0,016$) e Ignacio Correa (11 $\mu\text{g/l}$) (ANOVA, Tukey $p < 0,03$). Las concentraciones de $N-NO_3^-$ y $N-NH_4^+$ no registraron diferencias significativas (Tabla 1.1). No obstante, resulta de interés la comparativamente elevada concentración de amonio en Poblet (Enero 2012, 367 $\mu\text{g/l}$), ordenes de magnitud mayor a las concentraciones registradas en la reserva.

Tabla 1.1. Valores medios y rangos de variación del pH, conductividad ($\mu\text{S/cm}$), sólidos suspendidos (mg/l), ancho (m), profundidad (m), bicarbonato (mg/l) y nutrientes determinados ($\mu\text{g/l}$) en los sitios de muestreo. Re: Remes, Po: Poblet, IC: Ignacio Correa, Ar: Arregui, JB: Juan Blanco, Co: Confluencia.

	Re	Po	IC	Ar	JB	Co
pH	7.1(6-8)	7.8 (7-8)	7.5 (7-8)	7.3 (7-8)	7.9 (7-9)	7.5 (7-8)
Conductividad	315 (195-554)	204(151-292)	195(140-285)	813(594-1094)	474(134-1124)	323(248-397)
SS	18 (4-34)	123(34-289)	30(8-51)	14(10-20)	210(29-278)	12(6-17)
Ancho	8.8 (6-15)	11 (6-20)	17.5(10-25)	6.8 (2-15)	23 (20-25)	9 (2-15)
Profundidad	0.5 (0.4-0.8)	0.9(0.8-1)	1.2(1-2)	1 (0.5-2)	1 (1-1)	0.4 (0.3-0.5)
HCO₃	125 (90-185)	92(74-127)	90(63-137)	340(165-618)	208(65-480)	158(132-185)
N-NO₂⁻	14 (3-21)	20 (19-23)	11 (6-14)	10 (7-11)	11 (9-13)	15 (11-19)
N-NO₃⁻	161(71-237)	132(68-214)	107 (180-704)	77 (7-161)	72 (5-125)	89 (68-111)
PRS	921(549-1168)	735(635-882)	604 (492-704)	190(46-332)	101(76-123)	211(119-303)
N-NH₄⁺	73(17-108)	150(36-367)	25(5-73)	11(5-15)	51(5-133)	5(3-7)

Biocidas

En agua, solo se detectó la presencia de clorpirifos, endosulfan y endosulfan sulfato en Remes en Diciembre de 2011 (Tabla 1.2).

En sedimentos de fondo no se detectó la presencia de cipermetrina, ni endosulfan en los arroyos de la reserva, ni en Arregui de cuencas con ganadería extensiva. No obstante se detectó la presencia de clorpirifos en bajas concentraciones en todos los sitios excepto Ignacio Correa. Por el contrario, en el arroyo Pescado, se determinó la presencia de los tres biocidas mencionados, las concentraciones fueron

máximas en Remes, decreciendo aguas abajo. Se determinó la presencia de endosulfan y su producto de degradación, endosulfan sulfato, en concentraciones mayores a las de endosulfan (Tabla 1.2). El endosulfan sulfato en Remes fue un orden de magnitud mayor que en Poblet, 3,8 km aguas abajo, y no se detectó en Ignacio Correa, 8 km aguas abajo.

Tabla 1.2. Concentraciones de biocidas medidas en sedimento (ng/g) y agua (ng/l) durante el primer período de muestreo. Re: Remes, Po: Poblet, IC: Ignacio Correa, Ar: Arregui, JB: Juan Blanco, Co: Confluencia.

	Re		Po		IC		Ar			JB			Co	
	Dic	Mar	Dic	Mar	Dic	Mar	Dic	Mar	Abr	Dic	Mar	Abr	Dic	Abr
<u>ng/g sedimento</u>														
Endosulfan	31,88	4,05	20,83	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfato de END	155,6	37,64	80,4	nd	< lq	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cipermetrina	1,94	nd	1,48	nd	0,2	nd	nd	< lq	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Clorpirifos	4,88	7,41	2,34	4,03	< lq	nd	< lq	nd	1,42	nd	1,12	0,76	nd	0,76
<u>ng/l de agua</u>														
Endosulfan	8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfato de END	64	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cipermetrina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Clorpirifos	10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Ensamble de macroinvertebrados

Los macroinvertebrados fueron tratados indistintamente como taxones, debido a la imposibilidad de reconocer los filos u órdenes considerados a nivel de especie. Los taxones identificados corresponden a 54 entidades taxonómicas diferentes. Los sitios ubicados en la reserva se caracterizaron por ser los únicos donde se registró la presencia del orden Trichoptera. Entre los grupos mejor representados se registraron el orden Heteroptera y Amphipoda (*Hyaella*). En la cuenca del arroyo Pescado los taxones pertenecientes al orden Tricladida (Dugesiidae), Rhynchobdellida (Glossiphoniidae) y el filo Mollusca (*B. peregrina*) fueron los grupos taxonómicos mejor representados. El arroyo Remes se caracterizó también por ser el único sitio donde no se encontraron taxones del orden Amphipoda (*Hyaella*) y Diptera (Chironomidae). Asimismo en Remes, los taxones del filo Mollusca fueron el grupo más abundante. Los sitios de cuencas ganaderas presentaron variaciones entre ellos. Ignacio Correa se caracterizó por

la abundancia del orden Tricladida (Dugesidae) y Arregui por los órdenes Amphipoda (*Hyalella*) y Coleoptera (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Abundancia (ind.m⁻²) media de cada taxón colectado durante todo el período de muestreo para cada uno de los sitios muestreados. Re: Remes, Po: Poblet, IC: Ignacio Correa, Ar: Arregui, JB: Juan Blanco, Co: Confluencia.

Filo (u Orden)	Familia	Taxa	Re	Po	IC	Ar	JB	Co
PLATYHELMINTHE			25	0	101	43	0	0
Tricladida	Dugesidae	Dugesidae	25	0	101	43	0	0
ANNELIDA			48	108	31	33	1	6
Rhynchobdellida	Glossiphoniidae	Glossiphoniidae	48	108	31	33	1	6
MOLLUSCA			262	42	24	15	22	9
	Planorbidae	<i>Biomphalaria peregrina</i>	201	40	9	1	2	9
	Ampullariidae	<i>Pomacea canaliculata</i>	46	2	14	12	1	0
	Physidae	<i>Stenophysa marmorata</i>	12	0	0	0	0	0
	Hydrobiidae	<i>Heleobia</i>	0	0	0	1	0	0
	Ancylidae	<i>Gundlachia</i>	2	0	1	1	19	0
	Sphaeriidae	<i>Pisidium</i>	1	0	0	0	0	0
CRUSTACEA			3	13	660	835	148	244
Amphipoda	Hyalellidae	<i>Hyalella</i>	0	9	660	835	148	244
Podocopida	Cyprididae	Cyprididae	3	4	0	0	0	0
INSECTA								
Trichoptera			0	0	0	0	7	0
	Polycentropodidae	Polycentropodidae	0	0	0	0	7	0
Ephemeroptera			1	33	1	19	10	2
	Caenidae	<i>Caenis</i>	1	0	1	16	9	1
	Baetidae	Baetidae	0	33	0	3	1	1
Odonata			34	206	46	42	19	11
	Coenagrionidae	Coenagrionidae	0	1	0	22	0	0
	Protoneuridae	Protoneuridae	0	1	0	0	2	0
	Fam zyg. indet.	Fam Zyg ind	2	187	40	12	15	4
	Libellulidae	Libellulidae	22	7	5	5	0	0
	Aeshnidae	Aeshnidae	10	10	1	3	2	7
Heteroptera			9	53	14	40	83	41
	Corixidae	<i>Sigara</i>	1	3	0	3	0	0
		<i>Corixini</i>	0	6	0	11	1	3
	Mesovellidae	Mesovellidae	0	0	0	0	1	2
	Hydrometiidae	Hydrometiidae	0	0	0	0	2	0
	Pleidae	<i>Neoplea</i>	0	0	3	8	0	0
	Nepidae	Nepidae	0	0	0	5	0	0
	Notonectidae	<i>Notonecta</i>	0	30	0	1	77	1
	Belostomatidae	<i>Belostoma</i>	7	14	10	9	1	34
	Hebridae	<i>Lipogomphus</i>	0	0	0	2	0	1
	Veliidae	<i>Microvelia</i>	0	0	1	0	0	0
	Fam. indet	Heteroptera indet.	1	0	0	1	1	0
Coleoptera			68	33	48	132	10	15

	Curculionidae	Curculionidae	1	1	4	24	6	3
	Staphylinidae	Staphylinidae	4	0	1	2	0	1
	Crysmelidae	Crysmelidae	0	0	0	0	1	1
	Hydrochidae	<i>Hydrochus</i>	0	5	0	3	1	1
	Noteridae	<i>Suphis</i>	0	0	1	0	0	0
		<i>Hydrocanthus</i>	1	0	0	0	0	0
	Hydrophilidae	<i>Berosus</i>	0	1	0	1	1	2
		<i>Helobata</i>	0	0	0	1	0	0
		<i>Tropisternus</i>	5	3	9	17	1	0
		<i>Enochrus</i>	2	3	3	10	0	0
		<i>Anacaenini</i>	0	1	11	49	0	0
		<i>Hydrobiomorpha</i>	0	0	0	0	0	1
		Hydrophilidae indet.	6	0	1	10	0	0
	Scirtidae	Scirtidae	48	0	0	1	0	4
	Haliplidae	<i>Halipus</i>	0	0	0	3	0	0
	Dytiscidae	<i>Bidessini</i>	0	16	9	8	0	0
		<i>Laccophilus</i>	1	3	3	0	0	0
		<i>Laccodytes</i>	0	0	6	2	0	0
	Heteroceridae	Heteroceridae	0	0	0	1	0	2
Diptera			4	15	98	87	10	47
	Chironomidae	Chironomidae	0	13	82	33	9	22
	Culicidae	Culicidae	0	0	7	3	1	23
	Ephydriidae	Ephydriidae	0	0	1	15	0	1
	Stratiomyidae	Stratiomyidae	0	0	5	33	0	1
	Ceratopogonidae	Ceratopogonidae	0	0	2	3	0	0
	Tabanidae	Tabanidae	4	2	1	0	0	0
Abundancia media			114	126	256	312	103	125
Riqueza media			11	12	13	20	11	9

El análisis cluster mostró agrupamientos entre los ensambles de macroinvertebrados presentes en sitios con distinto uso del suelo ($R_{Global} = 0,623$; $p < 0,001$) (Figura 1.29). Puede observarse que los muestreos del sitio agrícola se agrupan todos juntos (A) al igual que los sitios con ganadería extensiva (B) y la mayoría de los sitios con ganadería intensiva (C). Los sitios de reserva no tienen una distribución clara (B, C, D y E).

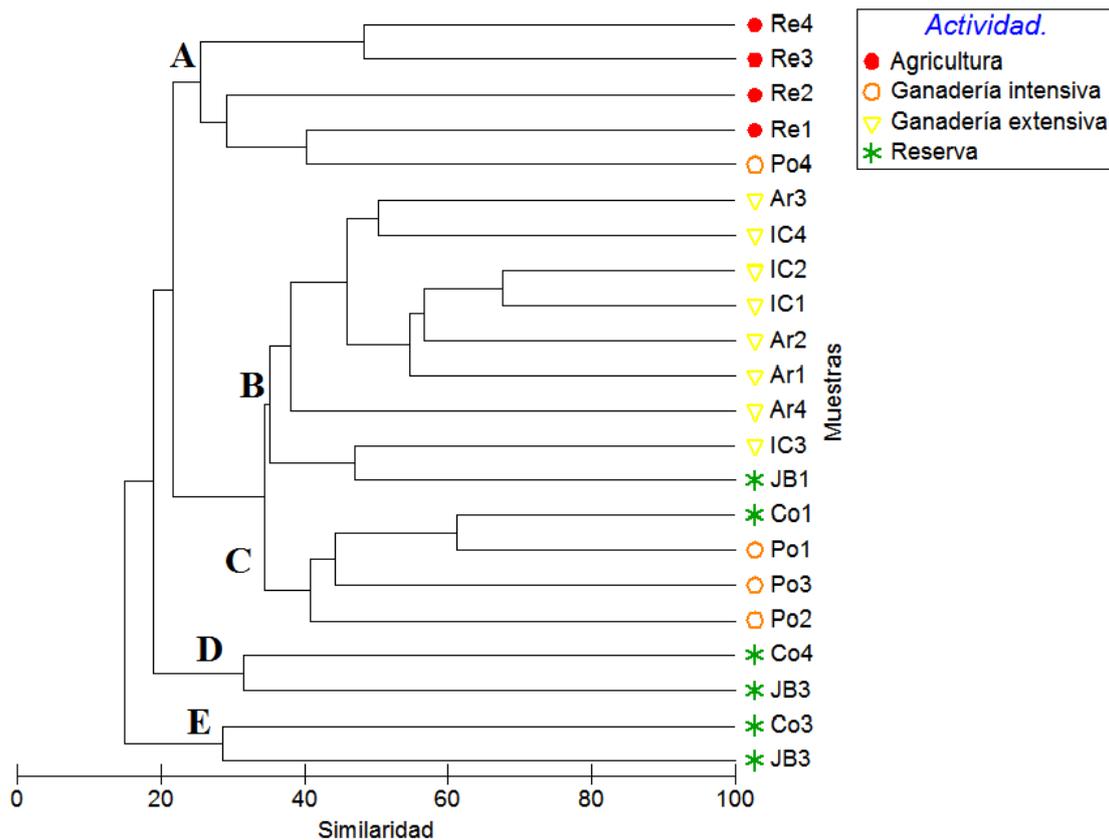


Figura 1.29. Cluster del ensamble de macroinvertebrados durante el período muestreado (agrupación por promedio entre grupos, transformación logarítmica e índice de Bray – Curtis). Re: Remes, Po: Poblet, IC: Ignacio Correa, Ar: Arregui, JB: Juan Blanco, Co: Confluencia.

El análisis ANOSIM muestra que existen diferencias significativas entre los distintos sitios muestreados (Global R = 0,408; p=0,001). Los sitios con uso del suelo contrastante mostraron diferencias significativas: Remes difiere significativamente de los sitios Arregui e Ignacio Correa (con ganadería extensiva) y de Juan Blanco y Confluencia (reserva). Así mismo Poblet se diferencia de Arregui e Ignacio Correa y Arregui de Juan Blanco (Tabla 1.4).

Tabla 1.4. Valores del análisis ANOSIM para los test de a pares que resultaron significativamente distintos. Se informa el R de cada par, cada uno con un nivel de significancia p<0,02.

Pares	Estadístico R
Remes vs Juan Blanco	0,87
Remes vs Arregui	0,81
Remes vs Ignacio Correa	0,6

Remes vs Confluencia	0,41
Poblet vs Arregui	0,69
Poblet vs Ignacio Correa	0,6
Arregui vs Juan Blanco	0,63

En el análisis SIMPER, se identificaron 20 taxones como los principales contribuyentes a la disimilitud de los sitios, representados por las familias Aeshnidae, Hydrophilidae (Anacaenini), Planorbidae (*B. peregrina*), Belostomatidae (Belostoma), Dytiscidae (Bidesini), Coenagrionidae, Caenidae, Chironomidae, Curculionidae, Ephyridae, Glossiphoniidae, Hyalelidae (*Hyalella*), Pleidae (Neoplea), Notonectidae (Notonecta), Ampullariidae (*P. canaliculata*), Dugesidae, Scirtidae, Stratiomyidae, Hydrophilidae (Tropisternus) y una familia indeterminada del Suborden Zygoptera. La contribución de estos taxones difiere entre los distintos sitios muestreados. En la Tabla 1.5 se muestran los taxones que contribuyeron aproximadamente en un 70% a la disimilitud entre los sitios. Asimismo se observa que el porcentaje de disimilitud entre pares de sitios se encuentra por encima del 70%, indicando una gran diferencia entre ellos.

Tabla 1.5. Resultado del análisis SIMPER. Se muestra el promedio de la abundancia relativa porcentual (% Abund.) y el porcentaje de contribución (Contrib. %) de los taxones que contribuyeron a la disimilitud de los sitios.

Taxones	%Abund	%Abund	Contrib%	Taxones	%Abund	%Abund	Contrib%
	Remes	IC			Poblet	Arregui	
% disimilaridad = 74,21				% disimilaridad = 75,94			
<i>Hyalella</i>	0	4,62	15,63	<i>Hyalella</i>	0,83	5,17	12,42
Zygoptera ind.	0,35	2,26	6,65	<i>B. peregrina</i>	1,84	0,17	5,31
Dugesidae	1,28	2,73	6,56	Zygoptera ind	2,4	0,95	5,02
<i>B. peregrina</i>	2,17	0,58	6,53	Glossiphoniidae	2,4	1,68	4,76
Chironomidae	0	1,71	5,22	Curculionidae	0,17	1,67	4,31
Scirtidae	1,59	0	4,97	Coenagrionidae	0,17	1,69	4,19
<i>P. canaliculata</i>	1,65	0,97	4,91	Anacaenini	0,17	1,76	3,88
Glossiphoniidae	2,12	1,77	4,38	Ephyridae	0	1,32	3,59
Libellulidae	0,95	0,58	3,78	Stratiomyidae	0	1,42	3,57
Aeshnidae	1,02	0,17	3,14	Dugesidae	0	1,38	3,34
Bidessini	0	0,93	3,06	Chironomidae	1,4	1,82	3,23
Tropisternus	0,69	0,83	2,82	<i>Notonecta</i>	1,43	0,17	3,04
Anacaenini	0	0,9	2,75	Baetidae	1,14	0,45	2,57
				Bidessini	0,87	0,79	2,49
				<i>Tropisternus</i>	0,35	1,09	2,46
				<i>P. canaliculata</i>	0,35	0,92	2,44
				<i>Belostoma</i>	1,15	0,87	2,41

			Caenidae	0	1,02	2,4	
	Remes	Arregui		Poblet	IC		
% disimilaridad = 81,94			% disimilaridad = 72,27				
<i>Hyaella</i>	0	5,17	13,34	<i>Hyaella</i>	0,83	4,62	13,77
<i>B. peregrina</i>	2,17	0,17	5,18	Dugesiiidae	0	2,73	9,02
Chironomidae	0	1,82	5,1	<i>B. peregrina</i>	1,84	0,58	6,1
Coenagrionidae	0	1,69	4,32	Glossiphoniidae	2,4	1,77	5,99
Curculionidae	0,17	1,67	3,93	Zygoptera ind	2,4	2,26	5,96
Dugesiiidae	1,28	1,38	3,83	Chironomidae	1,4	1,71	5,9
<i>P. canaliculata</i>	1,65	0,92	3,67	<i>Notonecta</i>	1,43	0	3,89
Glossiphoniidae	2,12	1,68	3,51	<i>P. canaliculata</i>	0,35	0,97	3,77
Ephydriidae	0	1,32	3,32	<i>Bidessini</i>	0,87	0,93	3,35
Stratiomyidae	0	1,42	3,32	<i>Belostoma</i>	1,15	0,9	3,14
Libellulidae	0,95	0,45	2,83	Anacaenini	0,17	0,9	2,85
				Baetidae	1,14	0	2,85
				Libellulidae	0,52	0,58	2,76
	Remes	JB		Arregui	JB		
% disimilaridad = 86,51			% disimilaridad = 75,41				
<i>Notonecta</i>	0	2,2	8,77	<i>Hyaella</i>	5,17	1,67	11,86
Glossiphoniidae	2,12	0,23	6,96	<i>Notonecta</i>	0,17	2,2	6,14
<i>B. peregrina</i>	2,17	0,46	6,83	Coenagrionidae	1,69	0	5,05
Scirtidae	1,59	0	5,58	Glossiphoniidae	1,68	0,23	4,33
<i>P. canaliculata</i>	1,65	0,23	5,5	Anacaenini	1,76	0	4,3
Chironomidae	0	1,25	5,01	Ephydriidae	1,32	0	3,88
<i>Hyaella</i>	0	1,67	4,86	Stratiomyiidae	1,42	0	3,85
<i>Gundlachia</i>	0,27	1	4,76	Chironomidae	1,82	1,25	3,64
Dugesiiidae	1,28	0	4,42	Dugesiiidae	1,38	0	3,58
Zygoptera ind	0,35	1,32	4,21	<i>Gundlachia</i>	0,17	1	3,54
Libellulidae	0,95	0	3,95	Zygoptera ind	0,95	1,32	3,45
Aeshnidae	1,02	0,37	3,67	Caenidae	1,02	0,77	3,15
Curculionidae	0,17	1,06	3,33	<i>Tropisternus</i>	1,09	0,23	2,72
				<i>P. canaliculata</i>	0,92	0,23	2,62
				Curculionidae	1,67	1,06	2,6
				<i>Neoplea</i>	0,95	0	2,57
				<i>Belostoma</i>	0,87	0,23	2
				<i>Bidessini</i>	0,79	0	1,84
	Remes	Confluencia					
% disimilaridad = 83,71							
<i>Glossiphoniidae</i>	2,12	0,65	6,97				
<i>Belostoma</i>	0,79	1,87	6,74				
<i>B. peregrina</i>	2,17	1,06	6,69				
Chironomidae	0	1,65	6,59				
<i>P. canaliculata</i>	1,65	0	5,98				
<i>Hyaella</i>	0	1,83	5,73				
Scirtidae	1,59	0,54	5,45				
Dugesiiidae	1,28	0	4,55				
Culicidae	0	1,06	4,22				
Aeshnidae	1,02	0,69	4,14				

Libellulidae	0,95	0	4,07
<i>Tropisternus</i>	0,69	0	3,03
Zygoptera ind	0,35	0,54	2,4
Staphylinidae	0,4	0,23	2,25

DISCUSIÓN

Las mayores concentraciones de PRS determinadas en la cuenca superior del arroyo Pescado, en Remes, donde el cultivo alcanza el borde del arroyo, se originan del aporte de los fertilizantes aplicados en las parcelas adyacentes.

Aguas abajo de Remes, en Poblet, se determinaron concentraciones significativamente mayores de nitritos y se determinaron elevadas concentraciones de amonio en coincidencia con un período de sequía (Enero del 2012). Las mayores concentraciones de amonio en Poblet no fueron transportadas desde la parte superior de la cuenca, (Remes) que en esa fecha no solo registró concentraciones menores de nutrientes, sino que además se interrumpió el cauce entre ambos sitios debido a la sequia. En Poblet, el arroyo es la única fuente de agua para el ganado que accede al mismo para beber, y las heces son un aporte de nutrientes al arroyo. Estas observaciones coinciden con la de otros autores quienes relacionan el nitrógeno con el aporte del ganado. Por ejemplo, Martínez (1994) atribuye que el aporte del ganado representa 247 mg de N por cabeza por día. Mugni et al. (2013) registraron que la concentración de N inorgánico en un arroyo de primer orden en Arrecifes (Buenos Aires) fue mayor cuando la parcela fue ocupada con ganado que cuando se cultivó soja sin fertilizar. Asimismo, Schepers & Francis (1982) mostraron un aumento de la concentración de nitrato y amonio en el agua de escorrentía superficial de pasturas con la incorporación de ganado.

En relación a los biocidas, estos fueron detectados en agua y sedimentos, donde las mayores concentraciones se registraron en Remes, las cuales disminuyeron aguas abajo. Se sabe que los biocidas ingresan al arroyo durante los eventos de escorrentía superficial (Jergentz et al. 2004; Mugni et al. 2011) causando toxicidad para la fauna residente. En los ambientes regionales Pampeanos varios autores han utilizado *H. curvispina* como organismo indicador de contaminación por ser un organismo de extensa distribución geográfica que comúnmente resulta dominante en los ensambles de invertebrados y es sensible a los biocidas. De acuerdo a estas observaciones, varios autores hacen referencia. Mugni et al. (2011) detectaron la ocurrencia de pulsos de toxicidad para *H. curvispina* en agua del cauce y de escorrentía superficial en

coincidencia con las primeras lluvias con posterioridad a la aplicación de biocidas en el cultivo adyacente, en el arroyo Pescado, en Remes, el mismo sitio de estudio de este trabajo. Mugni et al. (2012) y Paracampo et al. (2012) determinaron que el agua de escorrentía superficial de cultivos experimentales de soja resultó tóxica para *H. curvispina* hasta aproximadamente un mes con posterioridad a la aplicación de cipermetrina, clorpirifos y endosulfan. Jergentz et al. (2004) detectaron pulsos de toxicidad asociados a eventos de lluvia en otros arroyos de la provincia de Buenos Aires durante el período de aplicación de biocidas en los cultivos. En cuanto a la persistencia de los biocidas se sabe que estos tienen distinta vida media en el ambiente. Según Leonard et al. (2000) endosulfan tiene una vida media mayor que cipermetrina y clorpirifos. Asimismo, Leonard et al. (1999) determinaron la presencia de endosulfan sulfato varias semanas después de la aplicación de endosulfan. El endosulfan sulfato es un producto de degradación de endosulfan, que es también tóxico para la fauna de invertebrados. Barry et al. (1995) determinaron las dosis letales de endosulfan y endosulfan sulfato para *Daphnia carinata*, en 756 y 478 $\mu\text{g/L}$, respectivamente.

Liess & Von der Ohe (2005) estudiaron la concentración de biocidas y la composición de los ensambles de invertebrados acuáticos en 20 arroyos de Braunschweig, Alemania, muestreados durante varios años consecutivos y estimaron las Unidades Tóxicas para *Daphnia magna* en cada muestreo, definida como $UT = \log(\text{concentración biocida} / LC_{50})$. Los autores registraron que concentraciones de biocidas mayores que 1:100 de la concentración letal 50 de *D. magna* ($UT > -2$) causan cambios en la composición del ensamble. Schäfer et al. (2012), recopilaron trabajos sobre el efecto de los biocidas en la composición del ensamble de invertebrados en Europa, Siberia y Australia, determinando que concentraciones 1:100 de la LC_{50} para *D. magna* ($UT > -2$) en arroyos de cuencas no forestadas, reducían la abundancia de las especies más sensibles. En el presente estudio, los valores de UT estimados para la concentración de clorpirifos en agua en Remes, en diciembre (tabla 2.2) y la LC_{50} para *H. curvispina* calculada en este trabajo (0.38 $\mu\text{g/l}$) resultó -1,64. Si se estima la UT de endosulfan sumando las concentraciones de endosulfan y endosulfan sulfato y la LC_{50} - 48 hs para *H. curvispina* determinada en el presente trabajo, el valor estimado resulta $\log(72 \text{ ng/l} / 16.400 \text{ ng/l}) = -2,4$. Ambas concentraciones de endosulfán y endosulfán sulfato medidas en Remes en diciembre 2011 fueron más altas que la LC_{50} de *Chironomus tentans* en los sedimentos (You et al. 2004); consistente con la ausencia de quironómidos en Remes, mientras que están presentes en todos los demás sitios estudiados, donde las

concentraciones de los biocidas eran bajas o no se detectaban. La mayor proporción de endosulfan sulfato que endosulfan sugiere que el biocida fue aplicado con semanas de anterioridad del ingreso al arroyo por escorrentía superficial (Leonard et al. 1999). La soja se siembra en octubre - noviembre. Si se observa la presencia de plagas se aplican biocidas simultáneamente con la siembra y la fertilización. La última lluvia con anterioridad al muestreo ocurrió el 20/11/2011; en esa ocasión la precipitación fue 38 mm. Los biocidas que se detectaron en el cauce en diciembre ingresaron al arroyo dos semanas antes. Considerando una vida media de 1 a 7 días para los isómeros de endosulfan y varias semanas para endosulfan sulfato (Peterson & Batley 1993) la exposición en el momento de la escorrentía fue mucho mayor a los valores de UT calculados en el momento del muestreo y están en los rangos de valores que influyen en la composición de los ensambles (Liess & Von der Ohe 2005; Schäfer et al. 2012). La información disponible sobre la exposición a clorpirifos y endosulfan es consistente con la ausencia de *H. curvispina* y chironómidos en el sitio adyacente a cultivos (Remes) mientras que resultó dominante en la reserva y en sitios con ganadería extensiva evidenciando que la exposición a los biocidas aplicados en las parcelas adyacentes al arroyo es la causa de su ausencia en Remes. Liess & Von der Ohe (2005) clasificaron las especies de invertebrados características de arroyos alemanes en dos grandes grupos según su sensibilidad a los biocidas: SPEAR = especies en riesgo (de la sigla en inglés "Species at Risk") y SPENotAR = especies no en riesgo. Los taxones que resultaron mejor representados en Remes correspondieron a familias tolerantes a los biocidas: Planorbidae (*B. peregrina*), Scirtidae, Glossiphoniidae, Aeshnidae, Dugesiidae, Libellulidae. Por el contrario, familias consideradas sensibles a los biocidas no resultaron abundantes o estuvieron ausentes en Remes (Coenagrionidae, Corixidae, Caenidae). Los ensambles de macroinvertebrados acuáticos conforman uno de los grupos más utilizados en estudios de impacto ambiental; estos son capaces de reflejar las diferentes perturbaciones a través de cambios en la estructura del ensamble y permiten hacer una evaluación global de los arroyos (Hering et al. 2004). Los biocidas pueden ocasionar efectos subletales que eventualmente modifiquen la composición del ensamble (Relyea & Hoverman 2006). Estos efectos suelen ocurrir a concentraciones muy bajas del contaminante, posiblemente órdenes de magnitud inferior a las concentraciones letales. En referencia a esto, Baillieul et al. (1999) determinaron que la exposición a dosis subletales de biocidas afectó la velocidad de natación de *D. magna*. Asimismo, Faria et al. (2007) realizaron ensayos con larvas de *Chironomus riparius*, en

muestras de agua procedentes de campos de arroz; registrando inhibición en el crecimiento de *C. riparius* a concentraciones de endosulfan de 0,55 µg/l. Por su parte Christensen et al. (2005) compararon la eficiencia de la alimentación y la habilidad de nado de *D. magna* expuesta a concentraciones ambientalmente realistas de cipermetrina, registrando efectos con concentraciones de 0,05 µg/l del biocidas (aproximadamente 1:10 la LC₅₀). También Zaliznyak & Nuggeoda (2006) estudiaron la toxicidad subletal de clorpirifos en tres generaciones sucesivas del cladóceros *D. carinata*. Estos autores utilizaron concentraciones desde 0,005 (0,01 de la LC₅₀) a 0,500 mg/l durante 21 días. Sus resultados muestran que la exposición a clorpirifos afectó la supervivencia y la fecundidad de los individuos en la primera generación, y en la segunda generación afectó el tiempo de eclosión de la primera camada. Además, realizaron las LC₅₀ de los organismos de la tercera generación, registrando una disminución de la misma. Los autores concluyen que este biocida, aún en bajas dosis (0,005 mg/l) no puede ser considerado inocuo para el ensamble de invertebrados acuáticos.

Schäfer et al. (2007) estudiaron arroyos en dos áreas de Francia y Finlandia para ver el efecto de la exposición a biocidas. Demostraron que los biocidas influyen en la estructura y función de los ecosistemas lóticos y asociaron el estrés de biocidas con una disminución en el número de especies sensibles. Schäfer et al. (2012) compilaron información de estudios a campo en Europa, Siberia y Australia, concluyen que la abundancia de macroinvertebrados sensibles se redujo en un 27% a 61% en concentraciones inferiores a 1/100 de la CL₅₀ para *D. magna*. Se supone que los cambios en la composición del ensamble se producen debido a la sensibilidad diferencial a la exposición a bajas concentraciones de biocidas. Leonard et al. (1999) observaron que las densidades de Ephemeroptera y Trichoptera del Río Namoi, Australia se correlacionaron negativamente con la presencia de endosulfan proveniente del cultivo de algodón. Castillo et al. (2006) estudiaron la ocurrencia y efectos de los biocidas de un arroyo adyacente a una plantación de bananas, en Costa Rica. Todos los biocidas estudiados fueron detectados en aguas superficiales de la plantación de bananos durante los períodos de aplicación, con concentraciones máximas después de las aplicaciones. Las concentraciones de biocidas fueron menores a la LC₅₀ de los crustáceos. Evaluaciones ecológicas sobre el uso de biocidas en las plantaciones de banano estuvieron limitadas por falta de ensayos de toxicidad crónica a corto plazo sobre especies nativas sensibles, una condición que es común en la fauna de América del Sur, incluyendo Argentina. Ciertos taxones fueron más abundantes en los sitios de

referencia aguas arriba de las plantaciones de bananas. El análisis multivariado del ensamble de macroinvertebrados mostró que los sitios de plantación de banano fueron significativamente diferentes de los sitios de referencia. A raíz de las aplicaciones de biocidas, todos los sitios de plantación de banano mostraron cambios significativos en la composición del ensamble, con los mismos géneros siendo afectados en todos los sitios y para todos los biocidas. Al igual que en el presente trabajo se determinó entre otros cambios una mayor proporción de gasterópodos en los sitios impactados, alcanzando el 40 % de la abundancia total.

Los resultados obtenidos en el presente período son consistentes con la información bibliográfica disponible registrando un efecto de los biocidas aplicados en los cultivos sobre el ensamble de macroinvertebrados de los arroyos adyacentes con desaparición o menor representación de los grupos taxonómicos más sensibles, especialmente taxones de la familia Hyalellidae (*Hyalella sp.*).

SEGUNDA ETAPA

RESULTADOS

En los 10 muestreos realizados entre Diciembre 2012 – Octubre 2013, se muestrearon los arroyos Remes, Gato, Arregui, Sin Nombre, Confluencia, Destino y Morales. Los arroyos Gato, Morales y Destino no fueron muestreados en los meses de Diciembre 2012 y Enero 2013 ya que se encontraban secos (Figura 1.30).

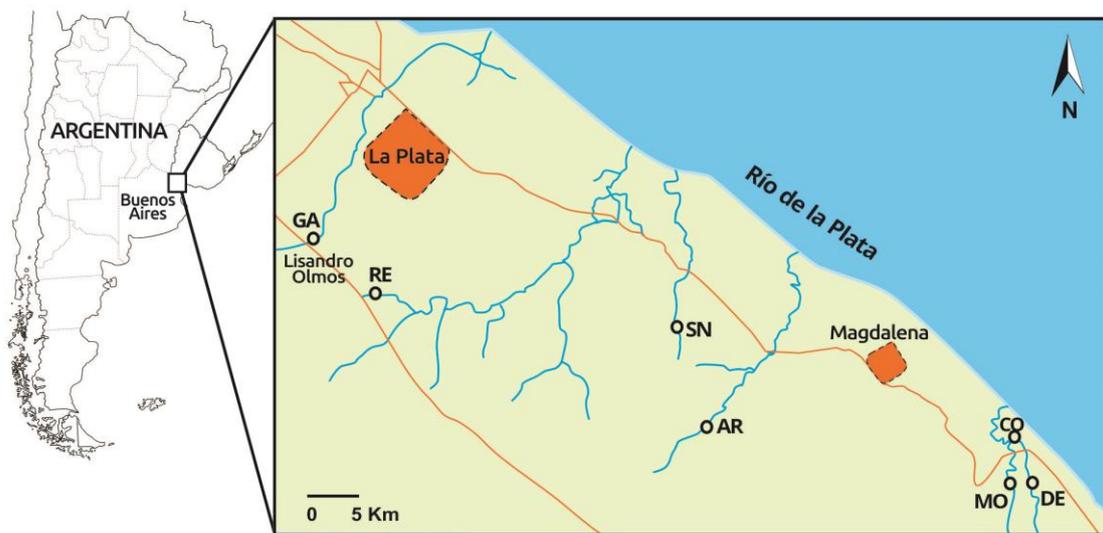


Figura 1.30. Sitios muestreados durante la segunda etapa. RE: Remes, GA: Gato, SN: Sin Nombre, AR: Arregui, CO: Confluencia, DE: Destino, MO: Morales.

Parámetros físicos y químicos

La profundidad y el ancho del cauce variaron considerablemente entre las distintas fechas de muestreos, con rangos de variación entre los 23 - 54 cm y 4 - 12 m respectivamente. La temperatura del agua registró una oscilación entre 6 y 31°C. Las precipitaciones tuvieron un amplio rango de variación entre 7,2 y 273 mm mensuales. El 2 de Abril de 2013 se produjo una lluvia excepcional que afectó toda la zona de estudio, registrándose una precipitación de 273 mm en 4 horas, la cual provocó un aumento del caudal igualmente excepcional. La comparación de los muestreos anterior y posterior a la lluvia permitió tener una idea de los cambios en el ensamble como resultado de un evento de gran magnitud.

La conductividad presentó diferencias significativas, siendo mayor en Arregui que en Sin Nombre y Remes. Asimismo, la conductividad media registrada en Gato, Confluencia y Morales fue mayor a la determinada en Sin Nombre. El pH resultó significativamente mayor en Gato que en Morales, Confluencia y Sin Nombre. No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de oxígeno disuelto. Los arroyos que registraron mayor cobertura vegetal de *L. peploides* (Remes y Sin Nombre) alcanzaron las mínimas concentraciones de oxígeno disuelto (0,9 – 1 mg/l) en verano (enero - febrero). Los sólidos suspendidos fueron mayores en Confluencia que Gato y la turbidez en Morales fue mayor que Arregui, Gato y Remes, que no se diferenciaron entre sí. No se observaron diferencias significativas en la concentración de clorofila. La turbidez se correlacionó positivamente con los sólidos suspendidos ($r = 0,746$; $p < 0.05$) y la clorofila ($r = 0,407$; $p < 0.05$).

Las concentraciones de nutrientes mostraron diferencias significativas entre los sitios. En el arroyo el Gato se registraron las mayores concentraciones de $N-NO_3^-$, $N-NO_2^-$ y $N-NH_4^+$. El $N-NO_3^-$ fue mayor en Gato que en los sitios ubicados en la reserva, y en cuencas ganaderas (Sin Nombre y Arregui). Asimismo el $N-NO_2^-$ fue mayor en Gato que en Arregui, Remes y Sin Nombre. Por su parte el $N-NH_4^+$ fue mayor en Gato que en Sin Nombre y Destino.

Las concentraciones de PRS fueron mayores en los arroyos Gato y Remes que en los de la reserva. Así mismo en Arregui las concentraciones de PRS fueron mayores que en Destino y Morales (Tabla 1.6). Las extremadamente elevadas concentraciones de PRS determinadas en verano en Remes y Sin Nombre (7075 y 1116 $\mu\text{g/l}$, respectivamente) fueron coincidentes con las menores concentraciones de oxígeno y máxima cobertura de macrófitas de *L. peploides*, siendo 7 veces mayor en el Remes.

El $N-NO_2^-$ y $N-NO_3^-$ se correlacionaron con el $N-NH_4^+$ ($r = 0,586$ y $r = 0,724$ respectivamente; $p < 0.05$).

Tabla 1.6. Valores medios mínimos y máximos de los parámetros ambientales determinados en los arroyos estudiados. Temperatura ($T^{\circ}\text{C}$), profundidad (cm), ancho (m), conductividad ($\mu\text{S/cm}$), pH, OD, SS ($\mu\text{g/l}$), turbidez (NTU), clorofila ($\mu\text{g/l}$) y nutrientes ($\mu\text{g/l}$). Co: Confluencia, De: Destino, Mo: Morales, Ar: Arregui, SN: Sin Nombre, Re: Remes, Ga: Gato.

	Co	De	Mo	Ar	SN	Re	Ga
T ($^{\circ}\text{C}$)	16 (6-34)	13 (6-17)	13 (6-18)	16 (6-31)	18 (7-31)	15 (8-25)	14 (9- 19)

Profundidad	37 (15-90)	34 (10-50)	27 (10-50)	23 (7-40)	35 (20-50)	34 (20-50)	54 (45-65)
Ancho	8 (5-9)	12 (8-16)	6 (5-8)	5 (4-7)	8 (5-16)	6 (3-12)	4 (3-7)
Conductividad	424(234-741)	428 (222-830)	432 (234-1058)	864(471-1251)	144(87-239)	277 (149-624)	536 (239-940)
pH	6,9 (5,8-7,5)	7,1 (6,4-7,6)	6,7 (6,4-7,1)	7,5 (6,7-8,1)	7,0 (6,2-8,6)	7,3 (6,8-7,9)	7,8 (6,7-8,8)
OD	7(2-13)	8 (3,5-13)	6 (3-14)	9 (4-13)	9 (1-14)	8 (1-16)	11 (4-23)
SS	60 (0,02-200)	50 (0,02-100)	120 (0,01-300)	20 (0,01-100)	80 (0,01-300)	30 (0,01-100)	10 (0,004-30)
Turbidez	93 (23-178)	84 (60-122)	193 (53-461)	31 (15-59)	126 (17-474)	47 (15-169)	39 (11-104)
Clorofila	13 (<5-38)	17 (<5-57)	27 (<5-57)	7 (<5-16)	62 (<5-202)	36 (<5-131)	18 (<5-36)
N-NO₃⁻	87 (<5-158)	80 (<5-129)	136 (<5-467)	580 (<5-4922)	200 (<5-1265)	236 (<5-923)	2442 (361-7737)
N-NO₂⁻	24 (12-39)	19 (11-46)	21 (<5-49)	11 (<5-26)	14 (<5-28)	15 (<5-36)	105 (22-255)
N-NH₄⁺	32 (<5-70)	15 (<5-44)	28 (<5-146)	55 (<5-160)	16 (<5-47)	38 (<5-114)	213 (9-1097)
PRS	38 (<5-76)	32 (<5-91)	34 (<5-119)	271 (49-839)	243 (27-1116)	1038 (15-7075)	865 (108-3798)

Biocidas

Endosulfán resultó ubicuo. Se determinó la presencia de endosulfán o su producto de degradación, endosulfán sulfato, en la mayoría de los arroyos. La mayor concentración se determinó en el arroyo agrícola Remes (Tabla 1.7). Algunas de las formas determinadas también estuvieron presentes en sitios agrícolas y de reserva, presentándose en bajas concentraciones, en el orden de unos pocos nanogramos por gramo de sedimento seco. Asimismo, se determinó la presencia de DDT o su producto de degradación DDD, en todos los ambientes estudiados. Los biocidas DDT y DDD fueron un orden de magnitud mayor en Gato que en los demás arroyos. Se determinó la presencia de heptacloro, que resultó un orden de magnitud mayor en Remes y Gato (Tabla 1.7).

Tabla 1.7. Concentraciones de biocidas (ng/g) en sedimento medidas durante el segundo período de muestreo. Co: Confluencia, De: Destino, SN: Sin Nombre, Re: Remes, Ga: Gato.

	Co		De		SN		Re			Ga	
	Feb	Dic	Dic	Feb	Dic	Ene	Feb	Abr	Feb	Abr	
	2013	2012	2012	2013	2012	2013	2013	2013	2013	2013	
Endosulfan I	18	nd									
Endosulfan II	nd	nd	21	6	nd	nd	3	nd	8	nd	
Endosulfan Sulfato	nd	4	nd	nd	nd	51	nd	nd	nd	nd	
Heptacloro	nd	nd	17	16	nd	40	19	110	21	269	

p-p' DDD	6	1	8	4	nd	9	nd	nd	6	57
p-p' DDT	nd	nd	nd	nd	4	2	nd	41	nd	39

Ensamble de macroinvertebrados

Al igual que lo mencionado en el primer período, durante esta etapa los macroinvertebrados fueron tratados indistintamente como taxones. Un total de 17.226 ejemplares pertenecientes a 66 entidades taxonómicas fueron identificados durante todo el período de muestreo (Tabla 1.8). El orden Amphipoda fue el grupo mejor representado en todos los arroyos excepto en Remes, donde el grupo dominante fue el orden Diptera. Mollusca fue el segundo grupo taxonómico más abundante en Destino, Morales, Sin Nombre y Remes, no siendo así en Confluencia, donde el orden Diptera fue el segundo grupo más abundante seguido de Coleoptera. El orden Rhynchobdellida (Glossiphoniidae) estuvo bien representado en Remes y resultó poco abundante en los arroyos de reserva y ganaderos. El orden Tricladida (Dugesiidae) estuvo ausente en la reserva, sólo se registró en los arroyos agrícolas y Arregui. Por el contrario, los órdenes Ephemeroptera y Odonata estuvieron ausentes en Gato y bien representados en los arroyos de reserva y ganaderos. El orden Trichoptera solo se registró en baja abundancia en Sin Nombre al igual que el orden Lepidoptera en Confluencia. Se observa que las menores abundancias fueron registradas en los sitios con agricultura (Tabla 1.8). La abundancia media de los sitio Sin Nombre y Destino (454 y 341 ind.m⁻² respectivamente) fueron significativamente mayores a las de Remes y Gato (73 y 17 ind.m⁻² respectivamente). Así mismo los arroyos Confluencia y Morales (341 y 255 ind.m⁻² respectivamente) presentaron mayores abundancias que las registradas en Gato (17 ind.m⁻²). En cuanto a la riqueza taxonómica, los sitios ubicados en la reserva y Sin Nombre (23 y 24 respectivamente) fueron significativamente mayores a Gato (10) y Arregui (16). La riqueza de Sin Nombre (24) fue mayor que la de Remes (16) (Tabla 1.8).

Tabla 1.8. Abundancia (ind.m⁻²) media de cada taxón colectado durante todo el período de muestreo para cada uno de los sitios muestreados. Co: Confluencia, De: Destino, Mo: Morales, Ar: Arregui, SN: Sin Nombre, Re: Remes, Ga: Gato.

Filo (u Orden)	Familia	Taxa	Abrev.	Co	De	Mo	Ar	SN	Re	Ga
PLATYHELMINTHES				0	0	0	7	0	7	13

Tricladida	Dugesiidae	Dugesiidae	Dug	0	0	0	7	0	7	13
ANNELIDA				4	10	22	2	18	94	17
Rhynchobdellida	Glossiphoniidae	Glossiphoniidae	Hir	4	10	22	2	18	94	17
MOLLUSCA				162	442	816	26	1115	133	19
	Sphaeriidae	Sphaeriidae 1	Sph1	0	0	1	0	1	15	0
	Sphaeriidae	Sphaeriidae 2	Sph2	0	0	0	0	9	19	0
	Ancylidae	<i>Gundlanchia</i>	Gun	2	12	11	3	73	11	1
	Planorbidae	<i>B. peregrina</i>	B.p	29	429	803	17	1025	36	5
	Ampullariidae	<i>P. canaliculata</i>	P.c	126	1	1	6	7	57	12
	Psysidae	<i>S. marmorata</i>	S.m	5	0	0	0	0	1	1
CRUSTACEA				1106	2452	1141	1644	2195	78	66
Decapoda	Palaemonidae	<i>P. argentinus</i>	P.a	3	0	0	10	0	0	0
Amphipoda	Hyalellidae	<i>Hyaella</i>	Hya	1101	2408	1086	1634	1683	21	65
Podocopida	Cyprididae	Cyprididae	Ost	2	44	55	0	512	57	1
INSECTA										
Trichoptera				0	0	0	0	6	0	0
	Limnephilidae	<i>Verger</i>	Ver	0	0	0	0	6	0	0
Ephemeroptera				104	132	95	115	413	7	0
	Baetidae	Callibaetis	Cal	14	0	0	0	0	0	0
		Baetidae indet.	Bae	75	116	95	22	409	7	0
	Caenidae	Caenidae	Cae	15	16	0	93	4	0	0
Odonata				159	284	54	51	343	47	0
	Aeshnidae	Aeshnidae	Aes	1	2	0	0	7	7	0
	Libellulidae	Libellulidae	Lib	6	15	4	0	16	0	0
		Anisoptera	Ani	0	1	0	1	2	0	0
	Coenagrionidae	Coenagrionidae	Coe	0	1	0	0	0	0	0
	Lestidae	Lestidae	Les	0	1	0	0	29	0	0
		Zygoptera ind	Zyg	152	264	50	50	289	40	0
Heteroptera				50	73	62	12	109	43	7
	Corixidae	<i>Corixini</i>	Cor	4	3	9	3	25	18	0
		<i>Sigara</i>	Sig	1	1	0	0	1	3	0
	Belostomatidae	Belostomatinae	Bel	10	0	0	4	10	0	1
		<i>Belostoma</i>	Bel	18	43	14	4	42	18	3
	Notonectidae	<i>Notonecta</i>	Nta	2	11	14	0	19	2	0
		Notonectidae	Nde	1	1	0	0	4	0	0
	Pleidae	<i>Neoplea</i>	Neo	13	13	18	0	5	1	0
	Nepidae	<i>Curicta</i>	Cur	0	0	1	0	0	0	0
	Aphidoidea	<i>Aphidoidea</i>	Aph	0	0	0	1	0	1	3
	Hebridae	<i>Lipogomphus</i>	Lip	1	1	6	0	3	0	0
Coleoptera				370	113	270	74	649	95	30

	Curculionidae	Curculionidae	Cur	63	7	65	2	20	1	1
	Haliplidae	<i>Haliphus</i>	Hal	0	0	0	0	3	0	0
	Crysmelidae	Crysmelidae	Cry	0	0	0	0	6	2	1
	Staphylinidae	Staphylinidae	Sta	0	0	1	0	1	0	0
	Noteridae	<i>Hydrocanthus</i>	Hyc	42	22	25	5	28	3	1
		<i>Suphis</i>	Sup	0	0	1	0	0	0	0
	Scirtidae	Scirtidae	Sci	20	0	0	0	0	2	0
	Hydrophilidae	<i>Tropisternus</i>	Tro	39	41	31	0	79	18	2
		<i>Berosus</i>	Ver	4	2	2	10	4	4	1
		<i>Derallus</i>	Der	8	1	5	1	15	1	0
		<i>Enochrus</i>	Eno	26	1	13	22	83	30	5
		<i>Anacaenini ind</i>	Ana	17	3	1	8	28	8	1
		<i>Hydrobiomorpha</i>	Hyb	11	0	17	0	10	0	0
		<i>Helochares</i>	Hel	1	0	2	1	1	0	0
		Hydrophilidae ind	Hyi	7	1	0	0	0	1	5
		<i>Crenitis</i>	Cre	0	0	0	0	0	1	0
		Hydrochidae	<i>Hydrochus</i>	Hyc	1	0	0	0	2	1
	Dytiscidae	<i>Bidessini</i>	Bid	91	12	72	23	242	15	10
		<i>Thermonectus</i>	The	0	1	0	0	1	0	0
		<i>Laccophilus</i>	Lap	26	10	14	0	62	4	0
		<i>Laccodytes</i>	Lad	12	9	19	2	61	4	1
		<i>Lancetes</i>	Lan	0	0	0	0	1	0	0
		<i>Megadytes</i>	Meg	1	3	1	0	1	0	0
	Elmidae	Elmidae	Elm	0	0	1	0	0	0	0
	Heteroceridae	Heteroceridae	Het	1	0	0	0	1	0	2
Diptera				686	245	346	101	150	303	40
	Chironomidae	Chironomidae	Chi	219	192	233	80	106	298	28
	Culicidae	Culicidae	Cul	9	10	5	2	31	0	2
	Tabanidae	Tabanidae	Tab	3	1	6	0	0	0	0
	Stratiomyiidae	Stratiomyiidae	Str	440	35	99	10	4	4	4
	Ceratopogonidae	Ceratopogonidae	Cer	10	5	3	8	1	1	0
	Ephydriidae	Ephydriidae	Eph	2	0	0	1	7	0	6
	Muscidae	Muscidae	Mus	0	0	0	0	1	0	0
	Tipulidae	Tipulidae	Tip	0	2	0	0	0	0	0
	Simulidae	Simulidae	Sim	3	0	0	0	0	0	0
Lepidoptera				5	0	0	0	0	0	0
		Lepidoptera	Lep	5	0	0	0	0	0	0

Abundancia media	241	341	255	185	454	73	17
Riqueza media	23	23	23	13	24	16	10

Los principales grupos taxonómicos registraron variación en la abundancia entre sitios durante todo el período muestreado (Figura 1.31). El orden Amphipoda mostró la mayor variabilidad en los arroyos de la reserva y ganaderos, abarcando desde bajas densidades en verano (1-3 ind.m⁻²) hasta importantes máximos en otoño y primavera (300-1225 ind.m⁻²). Por el contrario, en los arroyos de cuencas agrícolas, estuvieron ausentes en muchos muestreos en Remes y en un muestreo en Gato, alcanzando máximos de 10 y 35 ind.m⁻², respectivamente. A diferencia de lo anteriormente señalado, el Orden Diptera (Chironomidae), registró un máximo comparativamente elevado (281 ind.m⁻²) en Octubre, en Remes, mientras que en los demás sitios el máximo fue de 20-197 ind.m⁻² en Enero-Abril.

Resulta de interés señalar que a los 15 días con posterioridad al evento de lluvia de 273 mm, ocurrida el 2 de Abril de 2013, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la abundancia de los ensambles de cada sitio.

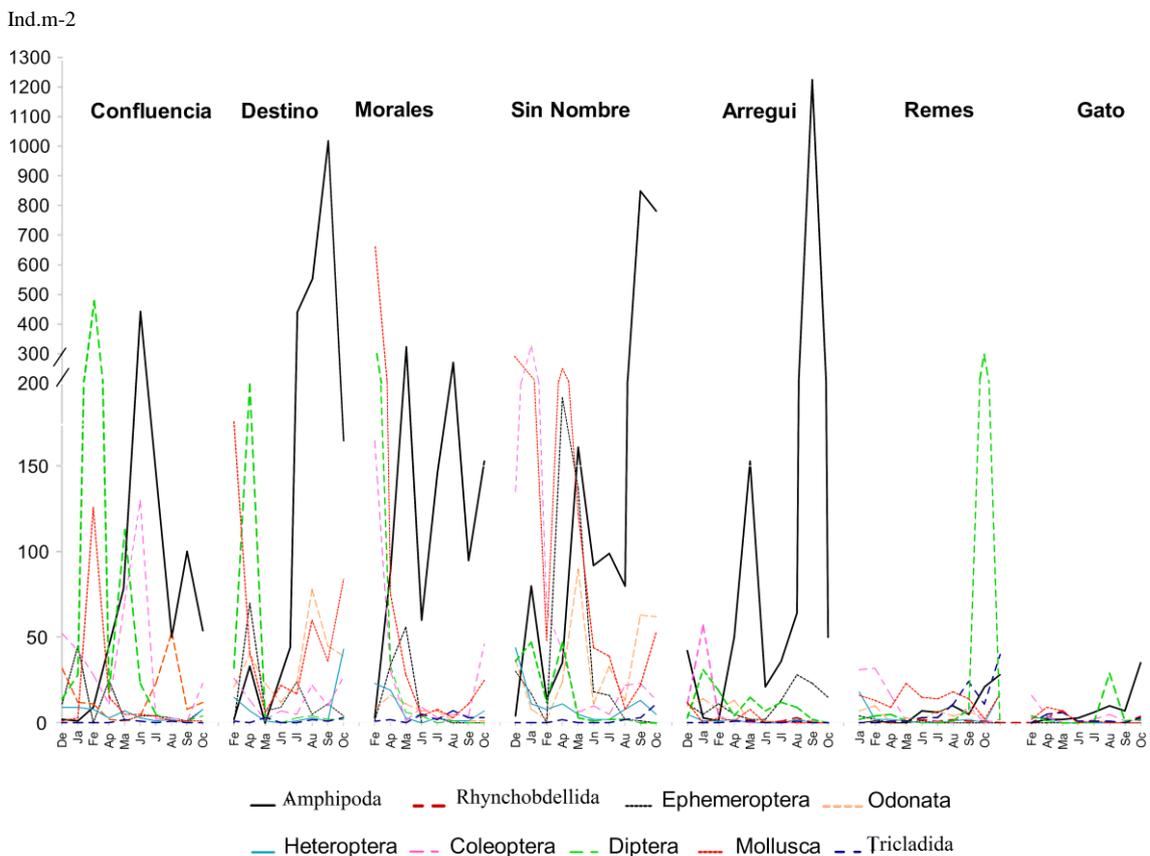


Figura 1.31. Variación en la abundancia de los grupos de macroinvertebrados entre los sitios muestreados.

En el análisis de agrupamiento CLUSTER se observa una clara separación del ensamble de macroinvertebrados de los sitios agrícolas ($R_{\text{Global}} = 0.854$, $p < 0.001$). La mayoría de los muestreos de los sitios agrícolas, se encuentran agrupados en A, B y C con excepción de 2 muestreos del arroyo Remes, que se encuentran en H junto con 2 muestreos del arroyo Confluencia y 1 del sitio Arregui. Los muestreos del sitio Arregui se encuentran en el grupo D y F junto con varios muestreos del sitio Confluencia y un muestreo del sitio Destino. La congregación E contiene los muestreos de los arroyos Morales, Destino y Sin Nombre. El grupo G incluye muestreos de los sitios Sin Nombre, Destino y Morales. El sitio Confluencia se encuentran en F y G (Figura 1.32).

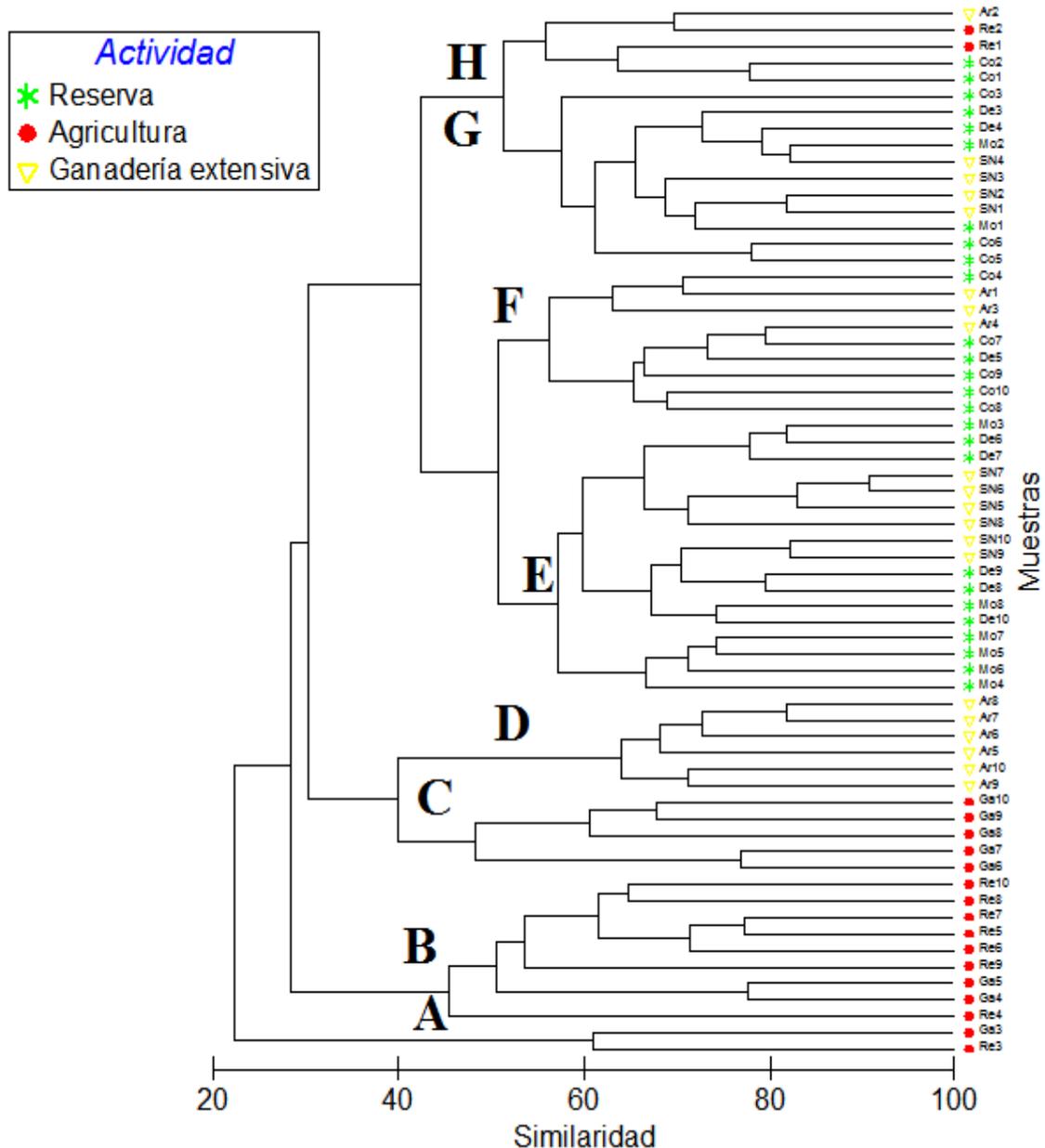


Figura 1.32. CLUSTER del ensamble de macroinvertebrados de todo el período muestreado (agrupación por promedio entre grupos, transformación logarítmica e índice de Bray – Curtis). Co: Confluencia, De: Destino, Mo: Morales, Ar: Arregui, SN: Sin Nombre, Re: Remes, Ga: Gato.

El análisis ANOSIM revela que existen diferencias significativas entre los ensambles de los diferentes arroyos (Global R = 0,448; p=0,001). Los arroyos Gato y Remes se diferenciaron de todos los demás y entre sí, con excepción del par Remes versus Morales. Así mismo el arroyo Arregui se diferencia significativamente de todos los demás sitios excepto del sitio Confluencia (Tabla 1.9).

Tabla 1.9. Valores del análisis ANOSIM para los test de a pares que resultaron significativamente distintos. Se informa el R de cada par con un nivel de significancia $p < 0,001$.

Pares	Estadístico R
Remes vs Arregui	0,701
Remes vs Sin Nombre	0,514
Remes vs Confluencia	0,566
Remes vs Destino	0,558
Gato vs Confluencia	0,635
Gato vs Destino	0,708
Gato vs Morales	0,556
Gato vs Arregui	0,554
Gato vs Sin Nombre	0,793
Gato vs Remes	0,447
Arregui vs Sin Nombre	0,746
Arregui vs Destino	0,586
Arregui vs Morales	0,564

En el análisis SIMPER se identificaron 16 taxones como principales contribuyentes a la disimilitud entre los pares de sitios que presentaron diferencias significativas entre ellos, representados por las familias Hyalellidae (*Hyalella*), Chironomidae, Planorbidae (*B. peregrina*), Glossiphoniidae, Cyprididae, Baetidae, Hydrophilidae (*Tropisternus*), Dytiscidae (*Bidessini*, *Laccophilus*), Ancyliidae (*Gundlachia*), Stratiomyidae, Noteridae (*Hydrocanthus*), Caenidae, Curculionidae y Ampullaridae (*P. canaliculata*) y una familia indeterminada del suborden Zygoptera. La familia Hyalellidae (*Hyalella*) es el taxón que más contribuyó en todos los sitios, con excepción del sitio Remes, donde el mayor promedio de la abundancia relativa porcentual corresponde a los taxones de la familia Glossiphoniidae y Ampullaridae (*P. canaliculata*). Cabe aclarar que si bien la familia Hyalellidae (*Hyalella*) es el taxón que más contribuye a la disimilitud en el sitio Gato, en relación a los sitios ganaderos y de reserva, el promedio de la abundancia relativa porcentual es menor. En la Tabla 1.10 se muestran los taxones que contribuyeron aproximadamente en un 70% a la disimilitud entre los sitios.

Tabla 1.10. Resultado del análisis SIMPER. Se muestra el promedio de la abundancia relativa porcentual (% Abund.) y el porcentaje de contribución (Contrib. %) de los taxones que contribuyeron en mayor medida a la disimilitud de los sitios.

Taxones	%Abund	%Abund	Contrib%	Taxones	%Abund	%Abund	Contrib%
	Arregui	SN			Gato	Confluencia	
% disimilaridad = 65,49				% disimilaridad = 75,29			
<i>B.peregrina</i>	0,46	3,92	12,55	Zygoptera ind	0	2,35	13,58
Cyprididae	0	2,92	11,48	<i>Hyaella</i>	1,65	3,71	13,51
Baetidae	0,88	2,33	7,27	Chironomidae	0,71	2,2	8,61
Zygoptera ind	1,31	2,95	7,14	Baetidae	0	1,33	6,53
Caenidae	1,91	0,18	6,68	Stratiomyidae	0,2	1,55	6,42
<i>Hyaella</i>	3,65	3,9	6,39	<i>Bidessini</i>	0,58	1,35	5,84
<i>Tropisternus</i>	0	1,58	5,66	<i>Tropisternus</i>	0,17	1,12	5,23
<i>Gundlachia</i>	0,18	1,44	5,5	<i>Hydrocanthus</i>	0,09	1,09	4,63
<i>Laccophilus</i>	0	1,51	5,33	Glossiphoniidae	0,9	0,25	4,41
	Arregui	Destino			Gato	Destino	
% disimilaridad = 58,36				% disimilaridad = 77,02			
<i>B. peregrina</i>	0,46	3,57	14,47	Zygoptera ind	0	3,39	14,8
Zygoptera ind	1,31	3,39	10,13	<i>Hyaella</i>	1,65	4,92	14,4
<i>Hyaella</i>	3,65	4,92	9,68	<i>B. peregrina</i>	0,36	3,57	13,52
Chironomidae	1,83	1,16	8,15	Baetidae	0	1,82	8,13
Caenidae	1,91	0,66	7,24	Chironomidae	0,71	1,16	5,55
Baetidae	0,88	1,82	6,88	Cyprididae	0,09	1,2	4,51
Cyprididae	0	1,2	5,19	<i>Tropisternus</i>	0,17	1,15	4,49
<i>Tropisternus</i>	0	1,15	5,03	Stratiomyidae	0,2	1,19	4,49
Stratiomyidae	0,44	1,19	4,71	<i>Hydrocanthus</i>	0,09	1,01	4,05
	Arregui	Morales			Gato	Morales	
% disimilaridad = 61,05				% disimilaridad = 72,06			
<i>B. peregrina</i>	0,46	3,07	12,1	<i>Hyaella</i>	1,65	4,45	16,68
Caenidae	1,91	0	9,8	<i>B. peregrina</i>	0,36	3,07	12,58
<i>Hyaella</i>	3,65	4,45	8,86	Cyprididae	0,09	1,57	8,69
Cyprididae	0	1,57	8,36	Zygoptera ind	0	1,7	8,68
Chironomidae	1,83	1,57	8,02	Chironomidae	0,71	1,57	6,83
Baetidae	0,88	1,21	6,36	Baetidae	0	1,21	5,66
Glossiphoniidae	0,21	1,19	5,59	Curculionidae	0,09	1,27	5,49
Zygoptera ind	1,31	1,7	5,44	<i>Bidessini</i>	0,58	0,94	4,54
Curculionidae	0,07	1,27	5,29				
	Remes	Arregui			Gato	Arregui	
% disimilaridad = 75,74				% disimilaridad = 71,32			
<i>Hyaella</i>	0,6	3,65	17,69	<i>Hyaella</i>	1,65	3,65	18,72
Caenidae	0	1,91	10,52	Caenidae	0	1,91	15,81
Chironomidae	1,19	1,83	8,78	Chironomidae	0,71	1,83	12,11
<i>P. Canaliculata</i>	1,54	0,19	8,01	Zygoptera ind	0	1,31	9,13
Glossiphoniidae	1,61	0,21	7,65	Glossiphoniidae	0,9	0,21	6,32

Cyprididae	1,36	0	7,21	Baetidae	0	0,88	5,98
<i>B. peregrina</i>	1,24	0,46	6,2				
Zygoptera ind	1,46	1,31	5,65				
	Remes	SN		Gato	SN		
	% disimilaridad = 66,06			% disimilaridad = 79,53			
<i>Hyaella</i>	0,6	3,9	12,45	<i>B. peregrina</i>	0,36	3,92	12,38
<i>B. peregrina</i>	1,24	3,92	9,56	Cyprididae	0,09	2,92	11,28
Cyprididae	1,36	2,92	8,98	Zygoptera ind	0	2,95	10,81
Baetidae	0,34	2,33	7,72	<i>Hyaella</i>	1,65	3,9	8,72
Zygoptera ind	1,46	2,95	6,18	Baetidae	0	2,33	8,07
Chironomidae	1,19	1,64	5,67	<i>Gundlachia</i>	0,09	1,44	5,58
<i>P. canaliculata</i>	1,54	0,23	5,3	<i>Tropisternus</i>	0,17	1,58	5,36
<i>Tropisternus</i>	0,51	1,58	5,26	<i>Laccophilus</i>	0	1,51	5,2
<i>Glossiphoniidae</i>	1,61	0,61	5,07	Chironomidae	0,71	1,64	4,95
<i>Gundlachia</i>	0,55	1,44	4,99				
	Remes	Confluencia		Gato	Remes		
	% disimilaridad = 70,33			% disimilaridad = 74,48			
<i>Hyaella</i>	0,6	3,71	15,01	<i>Hyaella</i>	1,65	0,6	11,21
Chironomidae	1,19	2,2	7,92	Zygoptera ind	0	1,46	10,96
<i>P. canaliculata</i>	1,54	0,48	7,48	<i>P. canaliculata</i>	0,58	1,54	10,19
<i>Glossiphoniidae</i>	1,61	0,25	6,45	Cyprididae	0,09	1,36	9,91
Cyprididae	1,36	0,14	5,91	Chironomidae	0,71	1,19	8,86
Stratiomyidae	0,16	1,55	5,61	<i>Glossiphoniidae</i>	0,9	1,61	8,77
Zygoptera ind	1,46	2,35	5,58	<i>B. peregrina</i>	0,36	1,24	8
Baetidae	0,34	1,33	5,34				
<i>Bidessini</i>	0,65	1,35	5,08				
<i>Tropisternus</i>	0,51	1,12	4,75				
	Remes	Destino					
	% disimilaridad = 66,31						
<i>Hyaella</i>	0,6	4,92	18,03				
<i>B. peregrina</i>	1,24	3,57	9,26				
Zygoptera ind	1,46	3,39	7,87				
Baetidae	0,34	1,82	6,9				
Chironomidae	1,19	1,16	6,36				
<i>P. canaliculata</i>	1,54	0,09	6,21				
Cyprididae	1,36	1,2	5,31				
<i>Glossiphoniidae</i>	1,61	0,66	5,16				
<i>Tropisternus</i>	0,51	1,15	4,65				

En los diagramas de Olmstead-Tukey realizados (Figura 1.33), se agruparon los sitios de la reserva junto con el sitio Sin Nombre, ya que estos no registraron diferencias en el análisis de ANOSIM. Así mismo, los arroyos agrícolas y Arregui, que en dicho análisis resultaron diferentes a los demás, se graficaron por separado. Los taxones de las familias Caenidae, Hydrophilidae (Hydrobiomorpha) y Libellulidae fueron dominantes

en los sitios de reserva y ganaderos y estuvieron ausentes en los sitios agrícolas. Por el contrario, Ampullaridae (*P. canaliculata*) fue dominante en los sitios agrícolas y ocasionales y raros en el resto de los sitios. Por su parte, las familias Sphaeriidae y Aeshnidae fueron dominantes en Remes, estuvieron ausentes en Gato y Arregui y se encontraron ocasionalmente en Sin Nombre y sitios de reserva.

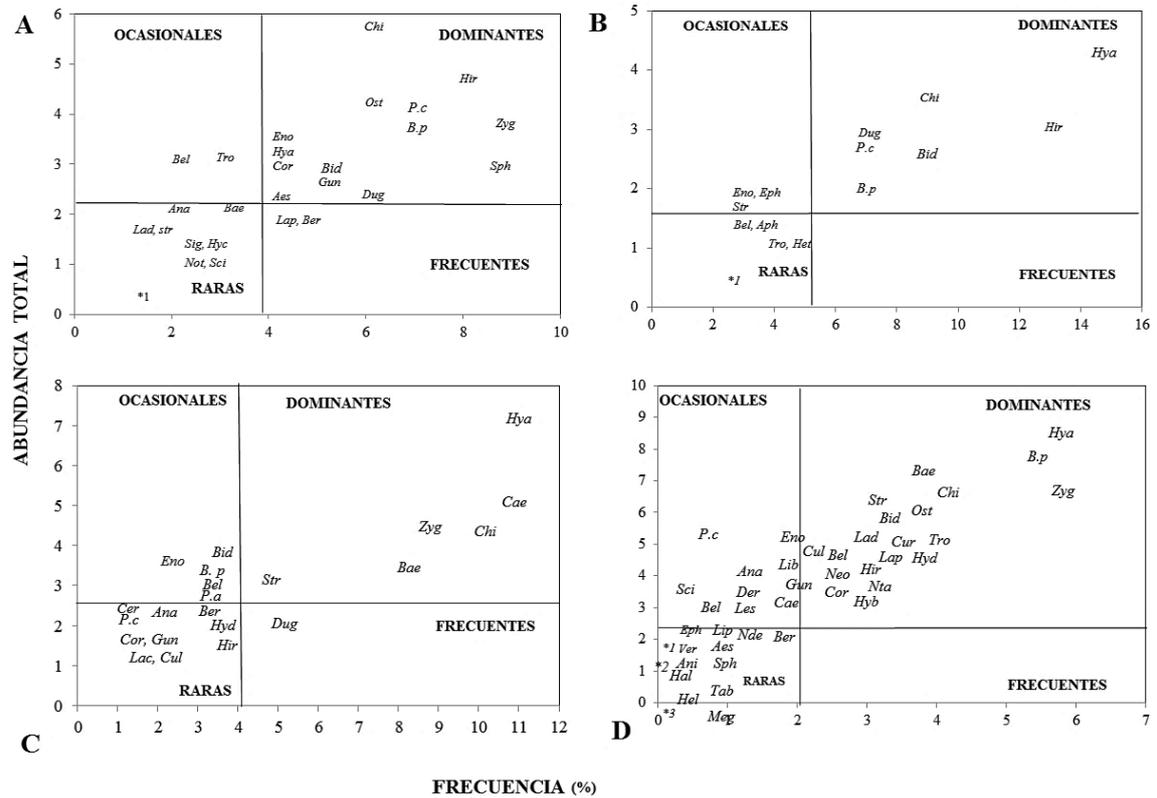


Figura 1.33. Diagrama de Olmstead-Tukey. (A). Remes. (*1) Neo, Aph, Cry, Der, Cre, Cer (B). Gato. (*1) Cur, Cry, Hyc, Ber, Lad, Cul, Gun, Ost (C). Arregui. (*1) Eph, Hel, Der, Cur, Aph (D). Reserva y Sin Nombre. (*1) Cry, Hdc, Tip, Hyd; (*2) Cal, Lep, Sim, P.a; (*3) Coe, Sig, Cur, Sta, The, Lan, Elm, Het, Mus, Sph. En la Tabla 1.8 se encuentra la codificación utilizada para nombrar los diferentes taxones.

DISCUSIÓN

Las mayores concentraciones de nutrientes se registraron en los arroyos de cuencas donde la agricultura y horticultura fue la actividad dominante. Esto es coincidente con lo hallado por otros autores. Mugni (2009) mostró que la concentración de nutrientes en el agua de escorrentía superficial del sitio Remes (el mismo punto que

en el presente trabajo), se relacionó con la fertilización de los cultivos adyacentes. La primera lluvia con posterioridad a la fertilización registró la mayor concentración de nutrientes. En el caso del nitrógeno inorgánico, la máxima concentración en los arroyos se registró cuando se aplicó un fertilizante líquido (mezcla de urea, nitrato y amonio) en el cultivo de maíz y la menor en los ambientes acuáticos que tuvieron en su cercanía cultivos de soja, que no se fertilizan con nitrógeno. Las mayores concentraciones de PRS determinadas en el arroyo Remes coincidieron con los muestreos siguientes a la fertilización. Asimismo Gabellone et al. (2005) observaron que la concentración de nutrientes en la cuenca alta del río Salado, donde predomina la agricultura intensiva, es mayor que en la cuenca baja donde prevalece la actividad ganadera. Finalmente, Jarvie et al. (2008) estudiaron la cuenca del río Taw, en Inglaterra, que muestra un gradiente en la intensidad de uso del suelo. En las nacientes, donde predominan las pasturas con baja densidad de animales, el 85 % de las concentraciones de PRS se hallaron por debajo del límite de detección (7 µg P/l) y la concentración media de nitratos resultó de 2 mg/l. En su cuenca media, donde predominan pasturas con mayor carga animal las concentraciones fueron mayores, y en la cuenca inferior, donde hay ganadería intensiva sobre pasturas fertilizadas y cultivos de maíz, las concentraciones de PRS fueron cinco veces mayores y las de nitratos alcanzaron los 17 mg/l.

Los arroyos de cuencas ganaderas no registraron diferencias en las concentraciones de nutrientes respecto de los arroyos de la reserva, como se mostró anteriormente en el primer período, donde se registraron altas concentraciones de amonio en Poblet. El arroyo Arregui presentaba escasa cobertura vegetal representada por *S. californicus* y las márgenes del arroyo estaban alambradas de modo que el ganado no tenía acceso al arroyo. En Poblet, la cobertura de la vegetación fue similar que en Arregui pero en este caso había una mayor carga animal que accedía al mismo para beber. Los arroyos Pampeanos tienen características que moderan la concentración de nitrógeno inorgánico. En particular, la escasa pendiente y la presencia de conspicua vegetación tienden a disminuir la concentración en el agua por absorción de las macrófitas y desnitrificación en los fondos orgánicos. Nguyen et al. (1999) estimaron una remoción neta del 54% del N total que ingresa a un humedal ripario localizado entre una pastura con ganado ovino y un pequeño arroyo en Nueva Zelanda. Schulz & Peall (2001) mostraron que un humedal construido en el cauce de un pequeño arroyo redujo en un 70% la concentración de nitrato proveniente de una parcela con frutales en Ciudad del Cabo, Sud África.

Las mayores concentraciones de biocidas, al igual que en el período anterior, también se registraron en los sitios agrícolas. Además se detectaron biocidas en la reserva donde no se hacen aplicaciones. Los Biocidas determinados registran elevada persistencia. La vida media del DDT en suelos es de 1,1 - 3,4 años (USEPA 2002). Heptacloro, DDD y DDT, son biocidas organoclorados muy volátiles que han sido prohibidos en la década de los 80'. El endosulfan también es un compuesto organoclorado. La vida media del α , β y endosulfan sulfato en suelos es de 27.5, 157 y 1336 días respectivamente, en condiciones aeróbicas (GFEA-U, 2007; USEPA 2007 a). El sulfato de endosulfan es tan tóxico como los isómeros de endosulfan (Barry 1996). Astoviza et al. (2015) determinaron las concentraciones de endosulfan en aire en 29 localidades de la región Pampeana Argentina. Las mayores concentraciones (media: 15 ng/m³) las determinaron en Olmos, localidad cercana a los sitios agrícolas de la presente tesis. Asimismo, se registraron concentraciones ordenes de magnitud más bajas en Magdalena (media: 0,17 ng/m³), cerca de la reserva, donde predomina la ganadería extensiva y no se realizan aplicaciones. Estos registros son consistentes con los resultados del presente estudio, donde las mayores concentraciones se dan cerca de los arroyos Remes y Gato y las concentraciones más bajas en la reserva, lo cual se relaciona con el transporte atmosférico. La ocurrencia de endosulfan en ambientes distantes a los sitios de aplicación es conocida, registrándose su presencia en sitios remotos como la Antártida (Weber et al. 2010).

En el muestreo correspondiente al 29/01/2013 se observaron bajas densidades de *H. curvispina* en Remes (21 ind.m⁻²), mientras que fue dominante en la reserva y en los sitios de ganadería extensiva (1081 ind.m⁻² en Morales y 2408 ind.m⁻² en Destino). En dicho muestreo se detectó la presencia de endosulfán en Remes, que no había sido detectado en el muestreo anterior (Tabla 1.7). La incorporación de los biocidas al cauce del arroyo se produjo con la última lluvia anterior al muestreo (de 30 mm) producida 2 semanas antes.

Durante el evento de lluvia excepcional de 273 mm, los restos de la vegetación retenida por los alambrados de las parcelas adyacentes sugieren un aumento igualmente excepcional en el caudal. Es interesante notar, sin embargo, que la abundancia no fue estadísticamente diferente entre los muestreos anterior y posterior, evidenciando que los cambios producidos por el aumento de caudal son comparativamente menores al efecto de la toxicidad que ingresa con la escorrentía superficial. Las observaciones registradas en la presente tesis son consistentes con las referidas por Liess & Von der Ohe (2005),

Liess & Schulz (1999), Liess et al. (2008), mostrando efectos comparativamente menores por el aumento de caudal que el producido por la exposición a biocidas.

En nuestro estudio se registraron diferencias significativas en la estructura de los ensambles de macroinvertebrados de los sitios de cuencas agrícolas. El análisis CLUSTER muestra una agrupación similar a la que se observa con los nutrientes, los sitios agrícolas se diferencian entre ellos, de los ganaderos y de reserva.

Durante este período también observamos que la mayoría de los taxones que resultaron dominantes en los sitios agrícolas son clasificados como tolerantes por Liess & Von der Ohe (2005). Taxones de la familia Caenidae, dominantes en sitios de reserva y ganaderos, clasificados como sensibles, no estuvieron representados en los sitios agrícolas.

Los arroyos de cuencas ganaderas no presentaron características homogéneas. La composición del ensamble de macroinvertebrados resultó distinta en Arregui y Sin Nombre. Otras características parecen influir en mayor medida que el efecto del ganado. La composición del ensamble en Arregui resultó distinta a las demás, excepto de Confluencia. Arregui se caracterizó por su menor abundancia de macrófitas, representadas casi exclusivamente por *S. californicus*, de escasa complejidad estructural. En Confluencia la dominancia correspondió también a *S. californicus*, si bien en este caso acompañada por *L. peploides* y *A. filiculoides*. Por el contrario, Sin Nombre, también de cuenca ganadera, registró los mayores valores de riqueza y abundancia y la composición del ensamble no difirió de los arroyos Destino y Morales, en la reserva. El arroyo Sin Nombre compartió con Destino y Morales la presencia de mayor cobertura y complejidad estructural de macrófitas, caracterizada por la presencia simultánea de varias macrófitas sumergidas y emergentes. La complejidad de las macrófitas ha sido asociada con una mayor abundancia y riqueza de macroinvertebrados (Ferreiro et al. 2014). Mientras que el efecto sobre la riqueza se ha atribuido a un aumento en el número de nichos, el efecto sobre la abundancia se ha explicado por una mayor disponibilidad de espacio para los pequeños individuos como refugio y / o alimento. Duggan et al. (2001), consideran que el tipo de vegetación, arquitectura y forma de crecimiento determina la distribución de macroinvertebrados. Walker et al. (2013) estudiaron el ensamble de macroinvertebrados de varios hábitats representados por distinta complejidad estructural y formas de crecimiento de las macrófitas. Las macrófitas con mayor grado de ramificación y disección de la hoja albergaron mayor número de macroinvertebrados aunque no necesariamente un mayor número de taxones.

Los autores observaron que el hábitat aguas abiertas fue significativamente el más pobre en términos de riqueza, diversidad y abundancia de especies. Ferreiro et al. (2014) llevaron a cabo experimentos de colonización de macrófitas con distinto grado de complejidad y de sustratos artificiales de distinta estructura espacial en laboratorio y en el arroyo Pampeano Las Flores, concluyendo que *Hyaella sp* prefería estructuras complejas, lo que indica que la selección activa puede ser importante para la distribución de macroinvertebrados en sustratos de complejidad contrastante. Del mismo modo, Hansen et al. 2011, encontraron una activa selección de las macrófitas complejas e imitaciones de plástico por *Gammarus oceanicus* (Amphipoda). La influencia de las macrófitas no estaba contemplada como un objetivo para la realización de la presente tesis. No obstante, surge a partir de la información lograda como un tema de interés que merece profundizarse en estudios posteriores.

TERCERA ETAPA

RESULTADOS

En los cuatro muestreos realizados entre Diciembre 2013 – Marzo 2014 se muestrearon los arroyos Gato, Remes, Afluente Pescado, Arregui, Sin Nombre, Confluencia, Destino y Morales. En Enero de 2014 el arroyo Morales no fue muestreado ya que se encontraba seco (Figura 1.34).



Figura 1.34. Sitios muestreados durante la tercera etapa de muestreo. RE: Remes, GA: Gato, AP: Afluente Pescado, SN: Sin Nombre, AR: Arregui, CO: Confluencia, DE: Destino, MO: Morales.

Parámetros físicos y químicos

La temperatura del agua registró una variación entre los 19 y 28 °C. Los valores de pH, OD, conductividad, sólidos suspendidos y clorofila entre los distintos sitios no registraron diferencias significativas (Tabla 1.11).

Las concentraciones de nutrientes mostraron diferencias significativas entre sitios con distinto uso del suelo en sus cuencas. Los sitios con actividad agrícola registraron las mayores concentraciones de $N\text{-NO}_2^-$, $N\text{-NH}_4^+$ y PRS que los sitios de reserva. Las concentraciones de $N\text{-NO}_3^-$ en sitios agrícolas fueron significativamente mayores a las medidas en los sitios ganaderos. Las concentraciones de nutrientes

determinadas en los sitios ganaderos y de reserva no se diferenciaron entre sí (Tabla 1.11).

Tabla 1.11. Valores medios mínimos y máximos de los parámetros ambientales. Temperatura (T°C), profundidad (cm), ancho (m), conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$), pH, OD, SS ($\mu\text{g}/\text{l}$), clorofila ($\mu\text{g}/\text{l}$) y nutrientes ($\mu\text{g}/\text{l}$) medidos en los sitios de muestreo. Se indica usos del suelo (Reserva, Ganadería y Agricultura). Re: Remes, Ga: Gato, AP: Afluente Pescado, SN: Sin Nombre, Ar: Arregui, Co: Confluencia, De: Destino, Mo: Morales.

	Reserva			Ganadería		Agricultura		
	Co	De	Mo	Ar	SN	AP	Re	Ga
T	21 (19-25)	23 (21-28)	23 (21-27)	25 (22-27)	24 (21-27)	24 (20-26)	23 (20-25)	23 (21-25)
Profundidad	38 (5-95)	31 (7-45)	33 (28-40)	28 (7-65)	29 (5-55)	19 (10-26)	41 (20-55)	51 (45-60)
Ancho	8 (5-11)	14 (10-18)	6 (5-7)	10 (5-15)	11 (4-15)	4 (1-6)	7 (5-11)	4 (3-6)
pH	7.4 (7.4-8.1)	7.5 (7.1-8.3)	7.5 (7.1-8.2)	8.0 (7.4-8.8)	7.2 (6.7-7.6)	7.7 (7.2-8.3)	7.3 (6.8-8.0)	7.6 (7.1-8.1)
OD	2 (0.5-5)	3 (1-7)	4 (1-5)	5 (2-8)	3 (0.4-6.6)	6 (6-7)	2 (1-3)	4 (1-7)
Conductividad	1378 (421-3930)	951 (353-2386)	532 (267-780)	1110 (756-1928)	264 (62-494)	340 (178-470)	210 (155-245)	390 (131-579)
SS	3 (0.5-7)	10 (0.5-28)	1 (1-2)	2 (1-5)	26 (1-70)	8 (4-12)	1 (1-2)	1 (0.4-2)
Clorofila	31 (3-86)	73 (8-169)	7 (5-11)	19 (5-49)	120 (34-332)	62 (12-111)	11 (6-24)	12 (5-19)
N-NO₂	8 (5-11)	11 (5-22)	5 (5-6)	9 (4-15)	22 (3-62)	20 (10-32)	43 (4-82)	33 (11-51)
N-NO₃	122 (97-149)	124 (80-166)	132 (102-149)	123 (101-162)	100 (80-135)	135 (103-194)	538 (117-1102)	644 (280-801)
N-NH₄⁺	17 (1-33)	23 (1-82)	4 (1-6)	21 (3-53)	105 (1-409)	12 (1-22)	98 (167-60)	80 (59-91)
PRS	42 (10-69)	26 (9-41)	34 (5-78)	436 (192-861)	180 (40-498)	1181 (385-3236)	1600 (558-4486)	1256 (475-3489)

Biocidas

En los arroyos de la reserva y de cuencas ganaderas no se detectó la presencia de endosulfan en sedimentos de fondo con excepción de Destino y Sin Nombre, que registraron bajas concentraciones (0,9-1,3 ng/g peso seco respectivamente) en un único muestreo (marzo 2014). En los arroyos de cuencas agrícolas (Remes y Gato), se detectó la presencia de endosulfan en todos los muestreos en un rango comprendido entre 3.6 - 8,2 ng/g peso seco en Gato y 3,7 - 35,8 ng/g peso seco en Remes. En el arroyo Afluente Pescado, de cuenca agrícola con una franja de atenuación entre el cultivo y el arroyo, las

concentraciones variaron en torno al límite de detección en 3 de los 4 muestreos resultando significativamente menores que en el arroyo Remes (Tabla 1.12).

Tabla 1.12. Concentraciones de biocidas (ng/g) en sedimento medidas durante el tercer período de muestreo. De: Destino, SN: sin Nombre, AP: Afluente Pescado, Re: Remes, Ga: Gato.

	De		SN			AP			Re				Ga			
	Mar	Mar	Mar	Dic	Ene	Feb	Mar	Dic	Ene	Feb	Mar	Dic	Ene	Feb	Mar	
Endosulfan	0,9	1,3	5,6	Nd	0,6	Nd	24,6	3,7	32,7	35,8	5,3	3,6	8,2	3,8		

Ensamble de macroinvertebrados

Como ya se mencionó para las dos etapas anteriores, en este caso los macroinvertebrados también fueron tratados indistintamente como taxones, debido a la imposibilidad de reconocer los filos u órdenes considerados a nivel de especie. Un total de 4688 ejemplares pertenecientes a 51 entidades taxonómicas diferentes fueron identificadas (Tabla 1.13). Las familias Dugesidae, Culicidae y Planorbidae resultaron los grupos dominantes en los arroyos agrícolas, juntos con la familia Hyalellidae, presente en menor densidad que en los sitios ganaderos y de reserva. Las familias Hyalellidae, Chironomidae y Planorbidae fueron los taxones mejor representados en los arroyos de la reserva y Dytiscidae, Ceratopogonidae y Planorbidae alcanzaron elevadas abundancias en los sitios de cuencas ganaderas.

Tabla 1.13. Densidad (ind.m⁻²) media de cada taxón colectado durante todo el período de muestreo para cada uno de los sitios muestreados. Co: Confluencia, De: Destino, Mo: Morales, Ar: Arregui, SN: Sin Nombre, Re: Remes, Ga: Gato, AP: Afluente Pescado.

Filo (u Orden)	Familia	Taxa	Co	De	Mo	Ar	SN	AP	Re	Ga
PLATYHELMINTHES			0	0	0	2	0	0	0	78
Tricladida	Dugesidae	Dugesidae	0	0	0	2	0	0	0	78
ANNELIDA			7	18	2	1	8	1	3	14
Rhynchobdellida	Glossiphoniidae	Glossiphoniidae	7	18	2	1	8	1	3	14
MOLLUSCA			14	48	962	25	643	96	28	44
	Sphaeriidae	Sphaeriidae	0	0	0	0	1	1	1	0

	Ancylidae	<i>Gundlachia</i>	8	0	3	21	1	8	1	1
	Planorbidae	<i>B. peregrina</i>	4	43	959	3	631	61	7	27
	Ampullariidae	<i>P. canaliculata</i>	1	5	0	1	10	26	19	14
	Physidae	<i>S. marmorata</i>	1	0	0	0	0	0	0	2
CRUSTACEA			97	119	83	49	161	5	22	67
Decápoda	Palaemonidae	<i>P. argentinus</i>	0	0	0	11	0	0	0	0
Amphipoda	Hyalellidae	<i>Hyalella</i>	96	113	67	35	46	3	20	67
Podocopida	Cyprididae	Cyprididae	1	6	16	3	115	2	2	0
INSECTA										
Ephemeroptera			16	19	13	17	14	8	1	0
	Baetidae	Baetidae	7	15	13	4	14	7	1	0
	Caenidae	Caenidae	9	4	0	13	0	1	0	0
Odonata			63	48	21	31	73	15	16	17
	Aeshnidae	Aeshnidae	17	13	6	0	11	1	8	1
	Libellulidae	Libellulidae	1	3	0	1	8	0	0	3
	fam. indet.	Zygoptera ind	45	28	15	30	54	14	8	13
Heteroptera			19	22	27	18	45	12	5	4
	Corixidae	<i>Corixini</i>	0	2	6	13	11	0	1	2
		<i>Sigara</i>	0	1	0	3	0	1	0	0
	Belostomatidae	<i>Belostoma</i>	16	11	16	0	15	2	4	1
	Notonectidae	<i>Notonecta</i>	1	6	2	0	15	9	0	0
	Pleidae	<i>Neoplea</i>	2	2	3	2	4	0	0	1
	Hebridae	<i>Lipogomphus</i>	1	0	0	0	0	1	0	0
Coleoptera			18	56	54	41	294	30	32	30
	Curculionidae	Curculionidae	1	2	10	0	9	3	3	3
	Haliplidae	<i>Haliphus</i>	0	0	0	0	2	0	0	0
	Crysolmelidae	Crysolmelidae	0	0	0	0	2	0	1	8
	Staphylinidae	Staphylinidae	0	0	0	0	0	0	1	1
	Noteridae	<i>Hydrocanthus</i>	2	12	7	0	3	1	0	1
		<i>Suphis</i>	0	1	1	0	1	0	0	0
	Scirtidae	Scirtidae	1	0	0	0	0	0	3	1

Hydrophilidae	<i>Tropisternus</i>	1	7	10	2	78	1	2	0	
	<i>Berosus</i>	1	3	3	11	4	3	0	0	
	<i>Derallus</i>	0	0	1	1	0	1	0	2	
	<i>Enochrus</i>	3	0	6	4	5	5	9	2	
	<i>Anacaenini ind</i>	3	4	1	4	7	4	5	2	
	<i>Hydrobiomorpha</i>	0	5	1	0	3	0	0	0	
	Hydrophilidae ind	0	0	0	0	0	1	0	0	
	Hydrochidae	<i>Hydrochus</i>	0	0	0	0	0	0	1	0
	Dytiscidae	<i>Bidessini</i>	2	10	5	14	133	9	7	9
		<i>Thermonectus</i>	0	1	0	0	0	0	0	0
		<i>Laccophilus</i>	1	8	2	3	19	2	0	0
		<i>Laccodytes</i>	1	0	1	2	4	0	0	1
		<i>Lancetes</i>	0	0	1	0	0	0	0	0
		<i>Megadytes</i>	0	1	0	0	0	0	0	0
Elmidae	Elmidae	2	2	1	0	4	0	0	0	
Heteroceridae	Heteroceridae	0	0	4	0	0	0	0	0	
Diptera		95	461	12	4	347	79	5	9	
Chironomidae	Chironomidae	84	430	7	2	102	1	0	2	
Culicidae	Culicidae	3	3	4	0	2	78	5	0	
Tabanidae	Tabanidae	3	1	0	0	1	0	0	0	
Stratiomyidae	Stratiomyidae	2	1	1	0	0	0	0	5	
Ceratopogonidae	Ceratopogonidae	0	26	0	1	241	0	0	0	
Ephydriidae	Ephydriidae	0	9	0	1	1	0	0	2	
Tipulidae	Tipulidae	0	1	0	0	0	0	0	0	
Abundancia media		81	198	389	47	391	61	27	64	
Riqueza media		11	16	16	13	19	10	10	12	

El análisis de agrupamiento CLUSTER (Figura 1.35) muestra una agrupación de los ensambles en cuencas agrícolas y hortícolas en los grupos A y B ($R_{Global} = 0.733$; $p < 0.00$) mientras que los arroyos de cuenca ganadera y de reserva no se diferencian entre sí y se distribuyen en los grupos C, D y E.

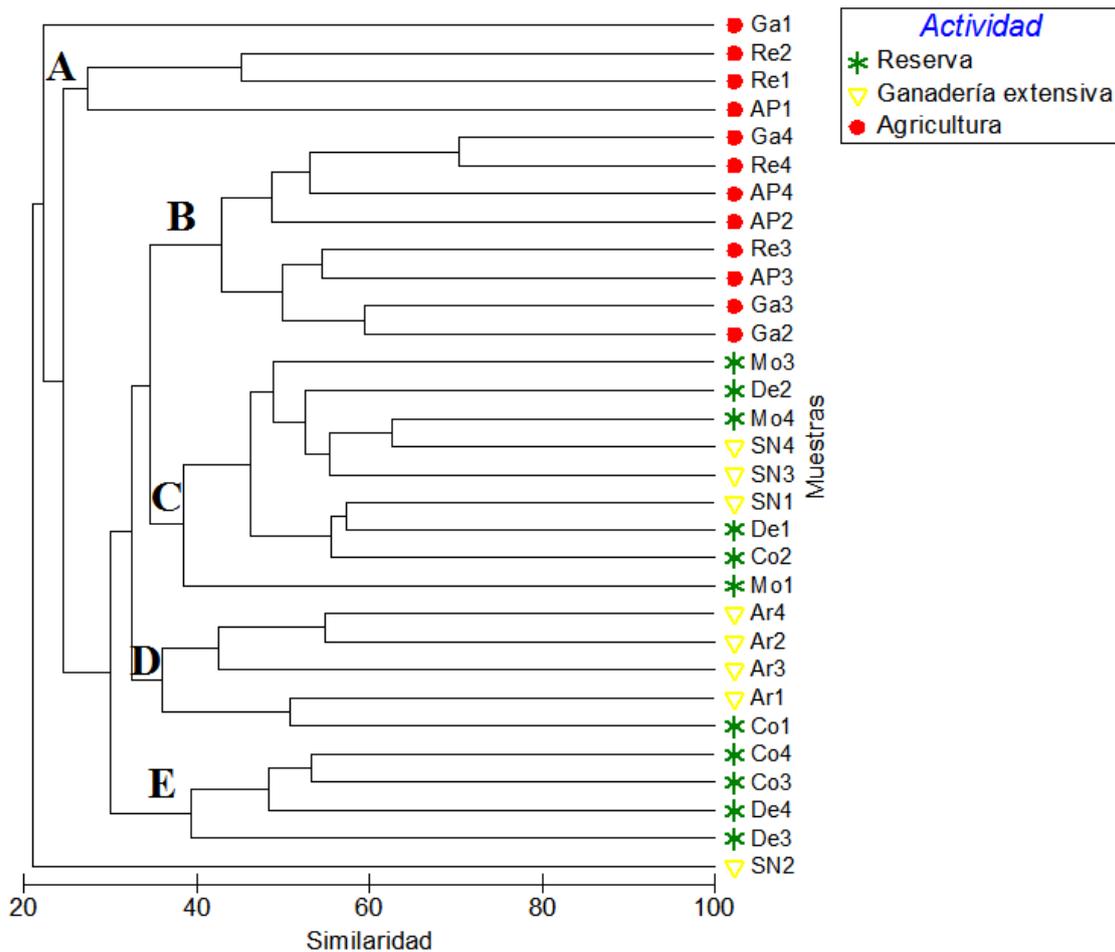


Figura 1.35. CLUSTER del ensamble de macroinvertebrados del período muestreado (agrupación por promedio entre grupos, transformación logarítmica e índice de Bray – Curtis). Co: Confluencia, De: Destino, Mo: Morales, Ar: Arregui, SN: Sin Nombre, Re: Remes, Ga: Gato, AP: Afluente Pescado.

El análisis de similitud (ANOSIM) determinó diferencias significativas entre los sitios de muestreo con un R global = 0.403 y un nivel de significancia de 0,001.

Los arroyos Remes y Gato, de cuencas agrícola, no se diferencian entre sí, y resultaron significativamente diferentes a los arroyos Confluencia, Destino y Morales, ubicados en la reserva y los sitios de cuencas ganaderas Arregui y Sin Nombre, con la excepción de Remes versus Morales que no difirieron. Los porcentajes de disimilitud entre estos pares se encuentran en un 70% indicando que existe una diferencia importante entre ellos. El ensamble de Afluente Pescado, de cuenca agrícola con franja de atenuación, difiere de los arroyos de cuencas ganaderas y del arroyo Confluencia,

pero no resultó significativamente distinto de los arroyos Morales y Destino de la reserva. Uno de los arroyos de cuenca ganadera, Arregui, difirió de los arroyos de la reserva mientras que el arroyo Sin Nombre, también ganadero, no registró diferencias significativas con los arroyos de la reserva (Tabla 1.14).

Tabla 1.14. Valores del análisis ANOSIM para los test de a pares que resultaron significativamente distintos. Se informa el R de cada par con un nivel de significancia $p < 0,029$

Pares	Estadístico R
Arregui vs Confluencia	0,51
Arregui vs Destino	0,615
Arregui vs Morales	0,667
Afluente Pescado vs Confluencia	0,625
Afluente Pescado vs Arregui	0,469
Afluente Pescado vs Sin Nombre	0,448
Remes vs Confluencia	0,635
Remes vs Destino	0,646
Remes vs Arregui	0,781
Remes vs Sin Nombre	0,646
Gato vs Confluencia	0,531
Gato vs Destino	0,479
Gato vs Morales	0,741
Gato vs Arregui	0,688
Gato vs Sin Nombre	0,542

En el análisis SIMPER se identificaron 26 taxones como principales contribuyentes a la disimilitud de los sitios, pertenecientes a las familias Hyalellidae (*Hyalella*), Chironomidae, Belostomatidae (*Belostoma*), Glossiphoniidae, Baetidae, Planorbidae (*B. peregrina*), Noteridae (*Hydrocanthus*), Dytiscidae (*Laccophilus*, *Bidessini*, *Laccodytes*), Hydrophilidae (*Berosus*, *Tropisternus*, *Enochrus*), Cyprididae, Curculionidae, Culicidae, Corixidae (*Corixini*), Ancyliidae (*Gundlachia*), Caenidae, Notonectidae (*Notonecta*), Aeshnidae, Ampullaridae (*P. canaliculata*), Dugesiidae, Crysomelidae y una familia indeterminada del Suborden Zygoptera. Se observa que la contribución de cada uno de estos taxones difiere entre los distintos sitios muestreados. En la Tabla 1.15 se muestran los taxones que contribuyeron aproximadamente en un 70% a la disimilitud entre los sitios.

Tabla 1.15. Resultado del análisis SIMPER. Se muestra el promedio de la abundancia relativa porcentual (% Abund.) y el porcentaje de contribución (Contrib. %) de los taxones que contribuyeron en mayor medida a la disimilitud de los sitios.

Taxones	%Abund	%Abund	Contrib%	Taxones	%Abund	%Abund	Contrib%
	Arregui	Confluencia			Remes	Arregui	
% disimilaridad = 67,52				% disimilaridad = 71,08			
Chironomidae	0,35	2,45	11,2	Caenidae	0	1,24	6,57
<i>Belostoma</i>	0	1,48	6,79	<i>P. canaliculata</i>	1,49	0,17	6,55
Zygoptera ind	2,1	1,83	6,33	<i>Gundlachia</i>	0,17	1,49	6,51
<i>Gundlachia</i>	1,49	0,55	6,22	Zygoptera ind	0,98	2,1	6,34
<i>Hyaella</i>	2,1	2,71	5,04	<i>Hyaella</i>	1,47	2,1	5,84
Caenidae	1,24	0,82	4,94	Aeshnidae	1,07	0	5,77
<i>Corixini</i>	1,01	0	4,43	<i>Corixini</i>	0,17	1,01	5,09
Glossiphoniidae	0	0,9	4,32	<i>Bidessini</i>	0,49	1,04	5,04
<i>Bidessini</i>	1,04	0,27	4,29	<i>Berosus</i>	0	0,92	4,61
<i>Berosus</i>	0,92	0,17	4,12	<i>Enochrus</i>	1,02	0,52	4,51
Aeshnidae	0	0,88	3,93	<i>P. argentinus</i>	0	0,77	4,04
<i>P. argentinus</i>	0,77	0	3,54	Culicidae	0,58	0	3,62
Baetidae	0,62	0,75	3,4	<i>B. peregrina</i>	0,85	0,45	3,48
<i>Anacaenini ind</i>	0,52	0,35	2,5	<i>Anacaenini ind</i>	0,45	0,52	3,47
	Arregui	Destino			Remes	SN	
% disimilaridad = 70,06				% disimilaridad = 74,47			
Chironomidae	0,35	1,79	7,35	<i>B. peregrina</i>	0,85	2,53	7,14
<i>B. peregrina</i>	0,45	2,26	6,51	Chironomidae	0	1,85	6,81
<i>Gundlachia</i>	1,49	0	5,61	<i>Bidessini</i>	0,49	2,24	6,04
Zygoptera ind	2,1	1,42	5,17	<i>Tropisternus</i>	0,27	2,04	5,97
Glossiphoniidae	0	1,34	5,01	Ceratopogonidae	0	1,54	5,86
<i>Belostoma</i>	0	1,24	4,44	<i>Ostracoda</i>	0,27	2,03	5,83
Caenidae	1,24	0,4	4,31	Zygoptera ind	0,98	2,21	5,41
<i>Hyaella</i>	2,1	2,39	4,26	<i>Hyaella</i>	1,47	2,07	4,6
<i>Hydrocanthus</i>	0	1,2	4,23	<i>Notonecta</i>	0	1,26	4,19
Baetidae	0,62	1,32	3,81	<i>Laccophilus</i>	0	1,39	4,17
<i>Corixini</i>	1,01	0,35	3,8	<i>P. canaliculata</i>	1,49	0,83	3,56
<i>Bidessini</i>	1,04	0,79	3,75	Baetidae	0,17	1,23	3,45
<i>Berosus</i>	0,92	0,52	3,59	<i>Belostoma</i>	0,45	1	2,91
<i>Laccophilus</i>	0,52	0,98	3,05	Aeshnidae	1,07	0,89	2,89
<i>P. argentinus</i>	0,77	0	2,97	<i>Corixini</i>	0,17	0,92	2,74
Ceratopogonidae	0,17	0,82	2,74				
	Arregui	Morales			Gato	Confluencia	
% disimilaridad = 69,03				% disimilaridad = 71,13			
<i>B. peregrina</i>	0,45	4,03	11,8	Chironomidae	0,27	2,45	11,07
Zygoptea ind	2,1	0,92	6,33	Dugesidae	2,19	0	9,62
<i>Hyaella</i>	2,1	2,67	4,86	<i>Hyaella</i>	2,18	2,71	6,76
<i>Gundlachia</i>	1,49	0,37	4,65	Zygoptera ind	1,12	1,83	6,46

Cyprididae	0,45	1,71	4,63	<i>Belostoma</i>	0,17	1,48	6,05
Caenidae	1,24	0	4,61	<i>P. canaliculata</i>	1,37	0,17	5,75
<i>Belostoma</i>	0	1,36	4,42	<i>B. peregrina</i>	1,35	0,45	4,72
Curculionidae	0	1,16	4,35	<i>Bidessini</i>	0,87	0,27	4,22
<i>Tropisternus</i>	0,27	1,42	4,28	Crysmelidae	0,87	0	4,01
Baetidae	0,62	1,26	3,95	Aeshnidae	0,17	0,88	3,91
<i>Bidessini</i>	1,04	0,83	3,91	Glossiphoniidae	1,27	0,9	3,8
<i>Corixini</i>	1,01	0,83	3,72	Caenidae	0	0,82	3,48
Culicidae	0	0,83	3,42	Baetidae	0	0,75	2,96
<i>Berosus</i>	0,92	0,46	3,37				
<i>Hydrocanthus</i>	0	0,88	3,06				
	AP	Confluencia			Gato	Destino	
	% disimilaridad = 77,40			% disimilaridad = 70,85			
Chironomidae	0,17	2,45	11,34	Dugesidae	2,19	0	8,41
<i>Hyalella</i>	0,62	2,71	9,88	Chironomidae	0,27	1,79	7,5
<i>B. peregrina</i>	2,55	0,45	9,09	<i>Hyalella</i>	2,18	2,39	5,5
Zygoptera ind	1,15	1,83	6,44	<i>B. peregrina</i>	1,35	2,26	5,22
Culicidae	1,09	0,35	6,4	<i>P. canaliculata</i>	1,37	0,45	4,84
<i>P. canaliculata</i>	1,47	0,17	6,21	Baetidae	0	1,32	4,53
<i>Belostoma</i>	0,35	1,48	5,07	Zygoptera ind	1,12	1,42	4,27
Glossiphoniidae	0	0,9	4,25	<i>Hydrocanthus</i>	0,17	1,2	4,06
<i>Gundlachia</i>	0,76	0,55	3,88	<i>Belostoma</i>	0,17	1,24	3,98
Aeshnidae	0,17	0,88	3,87	Glossiphoniidae	1,27	1,34	3,88
<i>Bidessini</i>	0,93	0,27	3,84	<i>Bidessini</i>	0,87	0,79	3,84
				Crysmelidae	0,87	0	3,48
				<i>Laccophilus</i>	0	0,98	3,43
				Aeshnidae	0,17	0,81	2,63
				Cyprididae	0	0,75	2,41
				Ceratopogonidae	0	0,82	2,41
	AP	Arregui			Gato	Morales	
	% disimilaridad = 71,94			% disimilaridad = 72,74			
<i>B. peregrina</i>	2,55	0,45	10,21	<i>B. peregrina</i>	1,35	4,03	9,79
<i>Hyalella</i>	0,62	2,1	8,05	Dugesidae	2,19	0	7,79
<i>P. canaliculata</i>	1,47	0,17	6,66	Cyprididae	0	1,71	5,97
Culicidae	1,09	0	6,25	<i>Hyalella</i>	2,18	2,67	5,65
Zygoptera ind	1,15	2,1	5,98	<i>P. canaliculata</i>	1,37	0	5,1
<i>Gundlachia</i>	0,76	1,49	5,77	Baetidae	0	1,26	4,95
Caenidae	0,17	1,24	5,66	<i>Tropisternus</i>	0	1,42	4,78
<i>Bidessini</i>	0,93	1,04	5,06	Zygoptera ind	1,12	0,92	4,6
<i>Corixini</i>	0	1,01	4,65	<i>Belostoma</i>	0,17	1,36	4,21
<i>Berosus</i>	0,35	0,92	4,37	Curculionidae	0,35	1,16	3,86
Baetidae	0,49	0,62	3,74	Glossiphoniidae	1,27	0,46	3,81
<i>P. argentinus</i>	0	0,77	3,73	Culicidae	0	0,83	3,35

				<i>Crysolmelidae</i>	0,87	0	3,2
				<i>Bidessini</i>	0,87	0,83	3,07
	AP	SN		Gato		Arregui	
	% disimilaridad = 74,93			% disimilaridad = 72,74			
<i>B. peregrina</i>	2,55	2,53	7,43	Dugesiiidae	2,19	0,27	9,26
<i>Tropisternus</i>	0	2,04	6,38	<i>Gundlachia</i>	0,17	1,49	5,9
Chironomidae	0,17	1,85	6,38	<i>Caenidae</i>	0	1,24	5,74
Cyprididae	0,27	2,03	5,57	<i>Hyalella</i>	2,18	2,1	5,72
Ceratopogonidae	0	1,54	5,52	<i>P. canaliculata</i>	1,37	0,17	5,7
<i>Hyalella</i>	0,62	2,07	5,29	Glossiphoniidae	1,27	0	5,58
<i>Bidessini</i>	0,93	2,24	5,07	Zygoptera ind	1,12	2,1	5,45
Zygoptera ind	1,15	2,21	4,97	<i>B. peregrina</i>	1,35	0,45	4,99
Culicidae	1,09	0,35	4,11	<i>Bidessini</i>	0,87	1,04	4,93
<i>Notonecta</i>	0,58	1,26	3,88	<i>Corixini</i>	0,17	1,01	4,54
<i>P. canaliculata</i>	1,47	0,83	3,76	Crysolmelidae	0,87	0	4,11
<i>Laccophilus</i>	0,27	1,39	3,63	<i>Berosus</i>	0	0,92	4,08
Baetidae	0,49	1,23	3,37	<i>P. argentinus</i>	0	0,77	3,56
<i>Belostoma</i>	0,35	1	2,76	Baetidae	0	0,62	2,87
Glossiphoniidae	0	0,92	2,71				
	Remes	Confluencia		Gato		SN	
	% disimilaridad = 70,39			% disimilaridad = 73,62			
Chironomidae	0	2,45	13,86	<i>B. peregrina</i>	1,35	2,53	6,77
<i>Hyalella</i>	1,47	2,71	8,37	Dugesiiidae	2,19	0	6,31
Zygoptera ind	0,98	1,83	7,51	<i>Tropisternus</i>	0	2,04	6,17
<i>P. canaliculata</i>	1,49	0,17	6,8	Chironomidae	0,27	1,85	6,1
<i>Belostoma</i>	0,45	1,48	6,03	Cyprididae	0	2,03	5,34
Aeshnidae	1,07	0,88	6,03	Ceratopogonidae	0	1,54	5,31
<i>Enochrus</i>	1,02	0,27	4,91	<i>Bidessini</i>	0,87	2,24	5,02
Glossiphoniidae	0,27	0,9	4,46	Zygoptera ind	1,12	2,21	4,84
<i>Caenidae</i>	0	0,82	4,02	<i>Hyalella</i>	2,18	2,07	4,46
Culicidae	0,58	0,35	3,87	<i>Laccophilus</i>	0	1,39	3,85
Baetidae	0,17	0,75	3,59	<i>Notonecta</i>	0	1,26	3,84
<i>Gundlachia</i>	0,17	0,55	3,41	Baetidae	0	1,23	3,45
				<i>P. canaliculata</i>	1,37	0,83	2,9
				Curculionidae	0,35	1,01	2,67
				<i>Belostoma</i>	0,17	1	2,62
	Remes	Destino					
	% disimilaridad = 72,01						
Chironomidae	0	1,79	8,3				
<i>B. peregrina</i>	0,85	2,26	5,96				
<i>P. canaliculata</i>	1,49	0,45	5,74				
Glossiphoniidae	0,27	1,34	5,32				
<i>Hyalella</i>	1,47	2,39	5,21				

<i>Hydrocanthus</i>	0	1,2	4,82
Baetidae	0,17	1,32	4,8
Zygoptera ind	0,98	1,42	4,69
<i>Enochrus</i>	1,02	0	4,52
Aeshnidae	1,07	0,81	4,32
<i>Laccophilus</i>	0	0,98	3,77
<i>Belostoma</i>	0,45	1,24	3,59
<i>Bidessini</i>	0,49	0,79	3,38
Culicidae	0,58	0,27	3,09
<i>Tropisternus</i>	0,27	0,68	2,69

DISCUSIÓN

Existen diferencias significativas entre los sitios agrícolas y los sitios ganaderos y de reserva, los cuales no se diferenciaron entre sí. En los sitios agrícolas se registraron altas concentraciones de nutrientes y la presencia de endosulfan. Lenat & Crawford (1994) estudiaron el efecto del uso del suelo (agrícola, urbano y bosque correspondiente a reserva en nuestro trabajo) en tres arroyos de Carolina del Norte. Estos observaron el mismo patrón que en nuestro estudio, con las mayores concentraciones de nutrientes en sitios agrícolas y más bajas en sitios boscosos. Egler et al. (2012) evaluaron la influencia del uso de la tierra sobre la calidad del agua en Río de Janeiro, Brasil. Vieron que los sitios con actividad agrícola registraron las mayores concentraciones de amonio, nitrato y fósforo. Song et al. (2009) estudiaron el impacto del uso del suelo en tributarios del Río Garonne (Francia). Observaron que la mayoría de los sitios agrícolas se caracterizaron por las altas concentraciones de nitrato. Mugni et al. (2013) sugieren que la intensificación agrícola causa el enriquecimiento de nutrientes de las aguas superficiales como consecuencia del aumento de las aplicaciones de fertilizantes, que son incorporados al arroyo por escorrentía superficial. En su trabajo comparan sus resultados con datos de la literatura y vieron que los arroyos que drenan áreas intensamente cultivadas presentan mayores concentraciones de nitrato que los que drenan pasturas o pastizales, mientras que arroyos que drenan áreas forestadas tienen menores concentraciones. Del mismo modo los autores destacan que la agricultura representa el principal aporte de nitratos a los arroyos. Las concentraciones de nitratos en Remes mostraron concentraciones decrecientes durante el período estudiado con el máximo y mínimo en los extremos del intervalo, compatible con una disminución

progresiva desde el momento de la fertilización del cultivo adyacente, que en el área de estudio se practica con la siembra, en octubre - noviembre. Las mayores concentraciones en el agua de escorrentía superficial en Remes se determinaron en coincidencia con las primeras lluvias con posterioridad a la fertilización (Mugni 2009). El arroyo Afluente Pescado, también agrícola, con una franja de pasturas naturales entre el cultivo y el arroyo no registró la misma variación temporal.

En los sedimentos de fondo de arroyos de cuencas agrícolas se detectó la presencia de endosulfán. Endosulfán es uno de los biocidas más usados en la región junto con cipermetrina y clorpirifos, y representa también el de mayor persistencia. Las concentraciones de endosulfán fueron significativamente mayores en Remes que en Afluente Pescado. Ambos arroyos se encuentran próximos entre sí y confluyen formando el arroyo Pescado (Figura 1.37); sus cuencas son de características ambientales similares, comparten los mismos suelos adyacentes y el mismo régimen hídrico. Durante este período, el cultivo adyacente a ambos sitios de muestreo fue maíz. La diferencia entre ambos sitios radica en que en Afluente Pescado se cultivó dejando una franja de pastura natural de 25 m en su margen derecho y 80 m en su margen izquierdo (Figura 1.5) mientras que en Remes el productor trabajó el suelo hasta el borde del arroyo. Los resultados muestran una importante reducción de la concentración por la franja de atenuación. Los resultados obtenidos en la presente tesis son consistentes con la de otros autores. Entre los que cabe mencionar Hunt et al. (2016) estudiaron la concentración de biocidas en una extensa región de Argentina, Paraguay y Brasil y determinaron que en todas las muestras donde las UT (unidades tóxicas) fueron superiores a 1 correspondieron a sitios donde la franja de atenuación tenía menos de 20 m. El ancho de la franja de atenuación, el contenido de carbono orgánico y la pendiente, mostraron correlación con las UT ($r^2 = 0.54$; $p\text{-value} = 0.009$). El ancho de franja de atenuación contribuyó con el 74% de la varianza explicada. La efectividad de las franjas de atenuación en la reducción del ingreso de biocidas a los arroyos ha sido citada reiteradamente. Bereswill et al. (2013) recopilaron 24 trabajos sobre el tema. Si bien existe una importante variabilidad en la literatura, las referencias son coincidentes en que los compuestos hidrofóbicos como son los usados regionalmente (cipermetrina, endosulfan, clorpirifos) que se adsorben a los sedimentos, por lo general presentan una eficiencia de retención mayor al 60%. Los modelos que los autores preconizan para estimar la retención asumen valores de 40%, 85% y 95% para franjas de atenuación de 5, 10 y 20 m. Borin et al. (2010) analizaron las distintas funciones de las franjas de

atenuación de investigaciones realizadas durante la última década en Italia. Entre otras funciones, demostraron que son una barrera eficaz para la retención de herbicidas, disminuyendo las concentraciones en un 60 % y 90%, dependiendo del tiempo transcurrido desde la aplicación. Reichenberger et al. (2007) recopilaron información de 14 estudios relacionados con la retención de biocidas en las franjas de atenuación. Demostraron una mayor eficiencia para los compuestos adsorbidos en la fracción particulada que para los compuestos solubles. Para los compuestos adsorbidos en la fracción particulada, como los que se usaron principalmente en nuestra área de estudio, la reducción promedio encontrada en los trabajos fue de 50% para franjas de cinco metros de anchura, 90% para diez metros de ancho y 97,5% para franjas de 20 metros.

Mugni et al. (2012) y Paracampo et al. (2012) determinaron que el agua de escorrentía superficial de cultivos experimentales de soja resultó tóxica para *H. curvispina* hasta aproximadamente un mes con posterioridad a la aplicación de cipermetrina, clorpirifos y endosulfan. You et al. (2005) realizaron ensayos de toxicidad aguda en sedimentos con endosulfan, endrina y metoxicloro en *H. azteca* y *Chironomus tentans*. Los autores observaron que la toxicidad del endosulfan fue mayor para *C. tentans* que *H. azteca*. Esto es consistente con lo observado en nuestro estudio, donde *H. curvispina* y Chironomidae estuvieron bien representados en los arroyos de reserva y de cuencas ganaderas, donde no se registró la presencia de biocidas. Contrariamente estuvieron ausentes o en bajas densidades en los arroyos de cuencas agrícolas. Chironomidae registró elevadas densidades en Destino (428 ind.m⁻², en marzo) y no se detectó en Remes o se detectó en bajas densidades (1-2 ind.m⁻²) en un único muestreo en Afluente Pescado y Gato. En cuanto a *H. curvispina*, también fue abundante en los sitios de reserva y ganaderos, y por lo general estuvieron en bajas densidades en los sitios agrícolas.

Según la clasificación de Liess & Von der Ohe (2005), los taxones que resultaron dominantes durante este período en las cuencas agrícolas fueron clasificados como tolerantes a los biocidas (Planorbidae, Glossiphoniidae, Dugesiidae). Asimismo las especies clasificadas como sensibles a los biocidas estuvieron ausentes o en baja densidad (Tipulidae, Tabanidae, Caenidae). Estos resultados son consistentes con el de otros autores que estudiaron el efecto de la actividad agrícola. Song et al. (2009) estudiaron el impacto del uso del suelo en tributarios del Río Garonne (Francia). Los autores concluyen que los arroyos agrícolas presentaban menor riqueza y diversidad de EPTC (Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera, Coleoptera) en relación a los arroyos

boscosos. Asimismo, Lenat & Crawford (1994) y Egler et al. (2012), al igual que el presente trabajo observaron que los sitios de cuencas agrícolas tienen menor riqueza y abundancia de taxones sensibles a los biocidas y que los grupos tolerantes resultaron ser los más dominantes.

El análisis SIMPER mostró que los arroyos Gato y Remes difieren de los arroyos de la reserva y ganaderos, con excepción de Remes vs Morales, mientras que Afluente Pescado, arroyo agrícola con franja de atenuación, donde la concentración de endosulfán fue menor a la de los demás arroyos agrícolas, solo difirió de Confluencia. Los resultados evidencian que las concentraciones determinadas de endosulfán están relacionadas con la magnitud de las diferencias en la composición de los ensambles y que las franjas de atenuación representan una protección del ensamble de macroinvertebrados en los arroyos de cuencas agrícolas. Bunzel et al. (2014) estudiaron la influencia de algunos parámetros ambientales sobre el efecto de los agrotóxicos en la composición de los ensambles de invertebrados acuáticos, estimados a partir de la aplicación del índice SPEAR. En este estudio concluyen que los sitios con ocurrencia de franjas de atenuación de más de 20 m contenían los mayores índices SPEAR y que la presencia de márgenes con franja de atenuación hasta 1 km aguas arriba del sitio de muestreo tenía influencia en el índice SPEAR. Los autores enfatizan la necesidad de contar con una franja de atenuación de al menos 5 m a lo largo de todo el curso de los arroyos. Rasmussen et al. (2011) evaluaron la toxicidad de biocidas sobre los macroinvertebrados bentónicos. Los autores encontraron que la anchura mínima de la franja de atenuación fue el parámetro más importante que se relacionó con las UT. Sus resultados ponen de manifiesto claramente la importancia de considerar las franjas de atenuación como herramientas de mitigación de riesgo en términos de contaminación por biocidas de fuentes no puntuales.

Al igual que lo observado en el período anterior, la composición del ensamble resultó significativamente distinta entre los arroyos de cuencas ganaderas. El arroyo Arregui difirió de los de la reserva mientras que el arroyo Sin Nombre no. La cobertura de macrófitas en el arroyo Sin Nombre fue semejante a la de los arroyos Destino y Morales en la reserva, con presencia de macrófitas arraigadas y emergentes que alcanzaron gran cobertura y complejidad estructural durante todo el muestreo realizado durante el verano. Por el contrario Arregui tuvo menor cobertura, de escasa complejidad estructural, representada casi exclusivamente por la presencia de *S. californicus*. Esto

indicaría, al igual que lo observado en el período anterior, que la complejidad de las macrófitas influye en la composición del ensamble de macroinvertebrados.

III

Ensayos de toxicidad

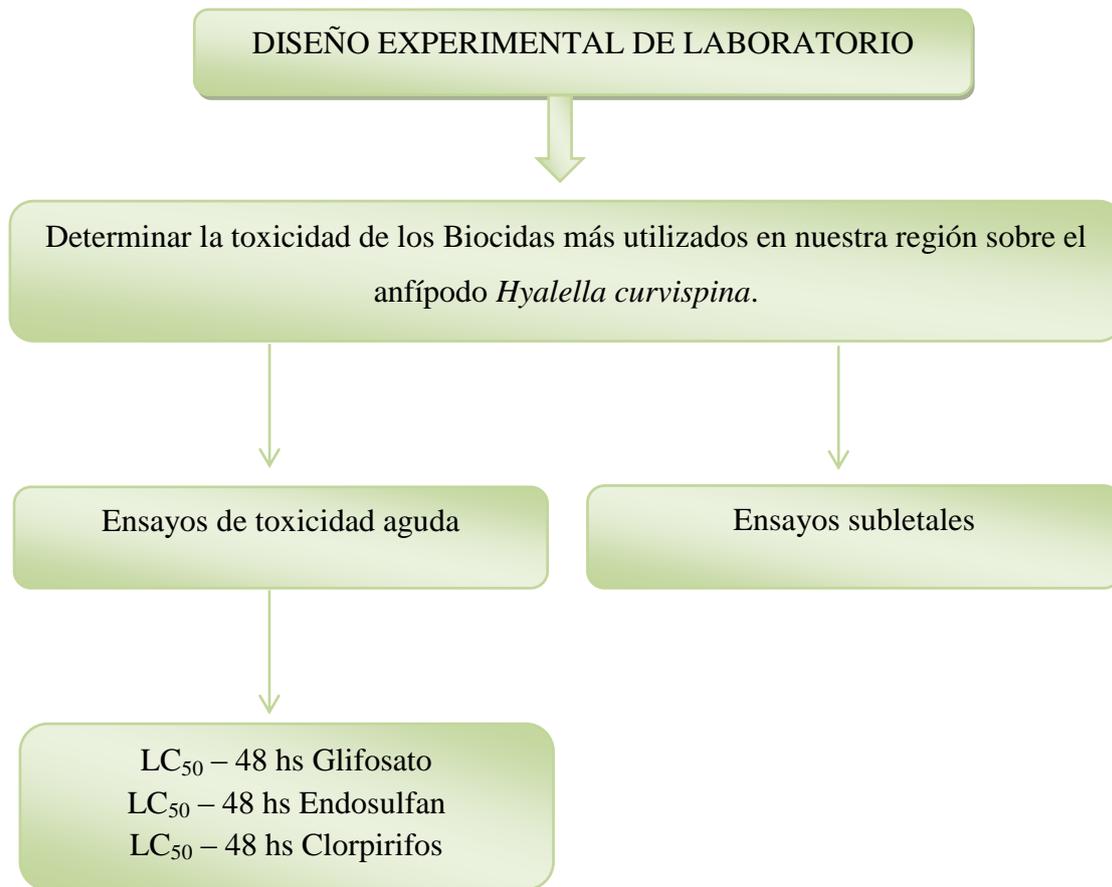


Figura 2. Diagrama de los ensayos realizados en el laboratorio.

ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

MATERIALES Y MÉTODOS

Individuos de *H. curvispina* fueron colectados de arroyos no contaminados localizados a 25 km al Sur de la ciudad de La Plata y transportados al laboratorio, donde fueron aclimatados y cultivados. Los individuos fueron mantenidos en contenedores plásticos con agua de los arroyos, que fue gradualmente reemplazada con agua de red declorinada para compensar la pérdida por evaporación. La superficie del agua se mantuvo cubierta con la macrófita *Lemna sp*, que habitualmente cubre la superficie en los arroyos donde *Hyalella* alcanza densidades importantes. Los cultivos fueron alimentados de la comunidad de perifiton de la rizósfera de *Lemna sp* y recibieron un agregado adicional de suplemento preparado con hojas de lechuga fresca y algas cultivadas, dos veces por semana (Mugni 2009, Mugni et al. 2010, Peluso 2011).

Los procedimientos de ensayos de toxicidad aguda para *H. curvispina* fueron similares a los protocolos para *H. azteca* (USEPA 2000; Mugni 2009). Diez individuos de *H. curvispina*, de 5 – 10 mm de longitud, fueron expuestos a distintas concentraciones de agrotóxicos, diluidos en 100 ml de agua reconstituida moderadamente dura (APHA 1995), en vasos de precipitado de 250 ml.

Tres réplicas de cada concentración ensayada fueron realizadas. Los ensayos fueron realizados sin alimento a 22 ± 2 °C y con un fotoperiodo natural que abarca de 13 – 11 horas luz/oscuridad en septiembre a 11 – 13 horas de luz/oscuridad en marzo. La mortalidad fue registrada a las 24 y 48 hs de exposición. Los individuos muertos fueron removidos inmediatamente. Como criterio de validez el control negativo fue considerado aceptable cuando los valores de mortalidad fueron menores al 10 %. Los datos de mortalidad obtenidos a las 48 hs se usaron para estimar la concentración letal cincuenta (LC₅₀). Los organismos fueron considerados muertos cuando no se observó ningún tipo de actividad.

Para encontrar las dosis de biocidas se realizaron test preliminares con un amplio rango de concentraciones. Cada curva de dilución para obtener la LC₅₀ estuvo formada por los controles y seis concentraciones ensayadas por triplicado. Como una práctica de control de calidad de laboratorio estándar se realizó un test de referencia con sulfato de cobre (SO₄Cu 5H₂O, 99,9% Merck). La LC₅₀ – 48 hs del control positivo fue de 265

µg/l, expresado como Cu II. Éste valor se encuentra dentro del rango aceptable determinado por Mugni 2009 (225 ± 79 µg/l, expresado como Cu II).

Ensayos de toxicidad para el herbicida Roundup

Se determinó la LC_{50} de glifosato en *H. curvispina* en seis ocasiones independientes durante un período de 9 meses entre Mayo 2011 – Febrero 2012.

En los ensayos de toxicidad del Roundup se utilizó el formulado Roundup Full II (66,2 % ingrediente activo), muy usado en la región. Una solución stock de Roundup (133 mg/l) con agua reconstituida moderadamente dura fue preparada (APHA 1998). Luego se prepararon distintas soluciones por dilución de la solución stock en agua reconstituida moderadamente dura. Tres réplicas por ensayo fueron realizadas. Las concentraciones nominales de glifosato fueron 2, 5, 7, 10, 15, 20, 25 mg/l. Se determinó la concentración de glifosato en las réplicas de las concentraciones nominales 2, 5 y 10 luego de 2 hs de exposición. Las concentraciones medidas fueron de 1,6; 3,6 y 8,7 mg/l respectivamente.

Determinación del Roundup

La determinación analítica del glifosato fue adaptada de Peruzzo et al. 2008. Las muestras fueron filtradas a través de una membrana Whatman de 0.45 µm (acetato de celulosa). El glifosato fue derivatizado por adición de 0.25 ml de buffer de borato 5% y 0.30 ml de FMOC-Cl (2 M mol/l) en $CHCl_3$ a 1 ml de muestra de agua a 40°C, mantenido en la oscuridad. La reacción se detuvo después de 24 hs por adición de 0.30 ml de H_3PO_4 (2%) y se mantuvo refrigerada hasta su análisis. El producto derivatizado (Gly – FMOC) fue analizado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (CRB – 6A: detector FLD, RF – 10 AXL, Shimadzu), usando una columna Supelco/Ascentis RP 18 (tamaño de partícula de 3 µm, longitud 100 mm e ID 3 mm). La fase móvil usada fue acetonitrilo: buffer de fosfato 0,05 M con un gradiente de elución a partir del 10 % de acetonitrilo y progresando linealmente a 40% de acetonitrilo, flujo: 0,5 ml/min; las condiciones de la detección de fluorescencia fue: excitación a 226 nm, emisión a 315 nm. El volumen de la muestra inyectada fue de 20 µl. Las mediciones cromatográficas fueron realizadas a 40°C. La recuperación media de la técnica analítica completa fue de

79% \pm 5% de glifosato. Todos los solventes anteriormente citados fueron de J. T. Baker. El límite de detección fue de 0,05 $\mu\text{g/l}$.

Ensayos de toxicidad para los Biocidas

Endosulfan

La LC_{50} de endosulfan fue determinada en *H. curvispina* en tres ocasiones durante los meses de Septiembre de 2011 -Marzo de 2012.

Para los ensayos de toxicidad de endosulfan se utilizó un estándar de Accustandard (98 % de ingrediente activo). Una solución stock de 176 mg/l con metanol grado analítica fue preparada (J. T. Baker). La concentración de la solución stock fue determinada analíticamente y la concentración fue del 95 %. Luego se prepararon diferentes diluciones de la solución stock en agua sintética moderadamente dura para las exposiciones (APHA 1998). Las concentraciones nominales fueron de 2, 10, 15, 20, 25 y 30 $\mu\text{g/l}$. Las concentraciones de endosulfan en las réplicas de concentración más baja fueron determinadas después de dos horas de la exposición. Las concentraciones medidas fueron $1,7 \pm 0,14 \mu\text{g/l}$. Con el fin de verificar que el metanol no causa toxicidad en las concentraciones ensayadas, tres réplicas de los controles fueron hechas adicionándoles metanol en igual cantidad que la presente en el tratamiento de exposición más alta. No se observó mortalidad en los controles.

Siguiendo el mismo procedimiento se realizaron los ensayos de toxicidad con el formulado comercial endosulfan marca comercial Master de la empresa Chemiplant (i.a 35% endosulfan). Se calculó la LC_{50} utilizando la mortalidad en las concentraciones nominales.

Clorpirifos

La LC_{50} de clorpirifos fue determinada en *H. curvispina* en tres ocasiones durante los meses de Septiembre de 2011 - Febrero de 2013.

En los ensayos de toxicidad de clorpirifos se utilizó un estándar (98% de ingrediente activo) de Accustandard. Se preparó una solución stock de 1 mg/l con metanol grado analítica (J. T. Baker). La concentración de la solución stock fue

determinada analíticamente y la concentración nominal fue del 97 %. Luego se prepararon diferentes diluciones de la solución stock en agua sintética moderadamente dura para exponer a *H. curvispina* (APHA 1998). Las concentraciones nominales fueron de 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 y 0,6 µg/l. Las concentraciones de clorpirifos en las réplicas de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 fueron determinadas después de 2 horas de la exposición. Las concentraciones medidas fueron 0,08; 0,14; 0,26; 0,32 µg/l respectivamente. Con el fin de verificar que el metanol no causara toxicidad en las concentraciones ensayadas, 3 réplicas de los controles fueron hechas adicionándoles metanol en igual cantidad que la presente en el tratamiento de exposición más alta (0.3 ml). No se observó mortalidad en los controles.

Se realizaron ensayos de toxicidad de formulados siguiendo el mismo procedimiento. Se utilizó el formulado Terfos de la empresa Chemotecnica (i.a 48% clorpirifos). Se calculó la LC50 utilizando la mortalidad en las concentraciones nominales.

Determinación de los biocidas

Para la cuantificación de los biocidas en el medio de exposición, la solución se pasó a través de una columna de C18 (Agilent, extracción en fase sólida, SPE, volumen 6 ml, 1 g de octadecilo (C-18) sorbente), las columnas fueron secadas en aire por 30 minutos y guardadas en freezer hasta su análisis. Los extractos se eluyeron de la columna de C18 con 2 ml de hexano seguido de 2 ml de diclorometano. Para determinar la recuperación de la columna de C18 se pasó a través de ella una solución de concentración conocida de biocida. La columna de C18 mostró una recuperación de endosulfan del 95 ± 3 % y de clorpirifos de 85 ± 8 %. Las muestras se almacenaron a -20 °C, después de 2 semanas de almacenamiento, se recuperó el 82 ± 15 % de los biocidas.

Los análisis de los biocidas fueron realizados por medio de cromatografía gaseosa utilizando un CG equipado con un micro detector de captura de electrones (µECDs) Hewlett Packard HP 6890, equipado con entradas de doble Split-splitless, software AngiletChenStation y un volumen de inyección de 2.0 µl. Para el análisis de los biocidas la columna analítica fue un HP1 (19091Z-433), columna capilar metilsiloxano reticulada de 30 m x 0,25 mm de diámetro interno x 0,25 µm de espesor

de la película. Tiempo de la columna: entrada a 190 °C por 4 minutos, rampa a 190 – 250 °C durante 20 minutos. El tiempo de retención para clorpirifos, endosulfan I y II fue de 6,5; 8,1 y 90 minutos respectivamente. El gas usado fue N de alta pureza (UHP) a 34 ml/min y la temperatura de entrada de 250 °C. La temperatura μ ECD fue de 320 °C con un flujo de gas constante de 60 ml/min N₂.

El límite de detección fue de 0,01 μ g/l. Todos los solventes utilizados, citados anteriormente, fueron de calidad analítica (J. T. Baker).

Análisis de los datos

Con las mortalidades totales a 48 horas de exposición se calculó la LC₅₀ y el límite de confianza del 95% para cada uno de los biocidas utilizando el análisis Probit del software de USEPA 1999. El nivel de significancia para todos los test aplicados fue de 0,05.

Para comparar la sensibilidad de *H. curvispina* con la de otras especies, se generó la curva de la distribución de sensibilidad de especies (SSDs) con el software Generador SSD de la USEPA (USEPA 2015 a), usando datos de toxicidad aguda a 48 hs de la base de datos de ECOTOX USEPA (USEPA 2015 b). La curva de distribución de sensibilidad de especies modela la variación en la sensibilidad de distintas especies a un estresor, que en este caso está representado por el biocida. En el eje de las X se graficó la intensidad del estrés, representada por la LC₅₀ a 48 h en escala logarítmica y en el eje de las Y se representó la proporción de las especies afectadas. Relaciona la proporción de especies que se espera que sean afectadas a distintas concentraciones establecidas (USEPA 2015 a).

Se estimó el riesgo ecológico por medio del cociente de peligro Harzand Quotient (HQ) (Giesy et al. 2000).

$$HQ = \text{nivel de exposición} / \text{valor de referencia de toxicidad}$$

El HQ es definido como la proporción entre la máxima concentración ambiental determinada y el valor de toxicidad de referencia (LC₅₀). Si el HQ es >1,0; se espera mortalidad en los organismos. Si el HQ es < 1,0, se espera que no ocurran efectos agudos en los organismos.

Se comparó la sensibilidad a la cipermetrina de *H. curvispina* con la de otras especies por medio del cálculo de la distribución de sensibilidad de especies (SSDs) con la LC₅₀ – 48 hs calculada por Mugni et al. 2013. Se estimó el riesgo ecológico (HQ) para dicha concentración.

Las diferencias entre las LC₅₀ de todos los biocidas fueron determinados por el análisis de varianza de una vía (ANOVA) para muestras independientes con el test a posteriori de procedimientos de múltiples comparaciones por pares (Test de Tukey), cuando los datos cumplen los supuestos de homocedasticidad y normalidad, de lo contrario se utilizó el equivalente no paramétrico de ANOVA, el método de Kruskal Wallis seguido por el procedimiento de comparaciones múltiples de a pares (Método Student-Newman-Keuls). El nivel de significación se fijó en $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Roundup

La LC₅₀ media fue de $9,9 \pm 1,7$ mg/l. No se observó mortalidad en los controles. Un aspecto importante en la idoneidad de los ensayos para el uso rutinario es la reproductibilidad (Suchayo et al. 2008). La baja variabilidad observada entre los ensayos independientes es indicativa de la alta reproductibilidad alcanzada para los ensayos con *H. curvispina* con el herbicida Roundup y los biocidas ensayados.

Tabla 2.1. Toxicidad aguda del formulado Roundup Full II para el anfípodo *H. curvispina* (mg/l), con un límite de confianza del 95%.

	Mayo 2011	Agosto 2011	Noviembre 2011	Diciembre 2011	Enero 2012	Febrero 2012
LC 1,0	40,2 (3,2-5,0)	5,1 (2,6-6,6)	3,8 (2-5,1)	3,8 (2,6-4,8)	4,0 (2,5-5,1)	5,4 (3,0-6,6)
LC 5,0	5,4 (4,3-6,1)	6,4 (3,8-7,9)	5,3 (3,4-6,8)	5,0 (3,8-6,2)	5,0 (3,4-5,9)	6,2 (4,0-7,2)
LC 10,0	6,0 (5,0-6,8)	7,3 (4,8-8,6)	6,3 (4,4-7,8)	5,9 (4,6-6,9)	5,5 (4,1-6,5)	6,6 (4,6-7,6)
LC 15,00	6,5 (5,6-7,3)	7,8 (5,5-9,2)	7,2 (5,2-8,7)	6,6 (5,3-7,6)	6,0 (4,6-6,9)	7,0 (5,0-7,8)
LC 50,00	9,1 (8,3-10)	11,1 (9,6- 12,5)	12,2 (10,4- 14)	10,2 (8,9- 11,6)	8,2 (7,2-9,2)	8,6 (7,5-9,3)
LC 85,00	12,8 (11,6- 14,8)	15,8 (13,8- 20,6)	20,6 (17,4- 27,2)	15,8 (13,7- 19,5)	11,3 (10,1- 13,8)	10,6 (9,8- 12,5)
LC 90,00	13,9 (12,4- 16,3)	17,1 (14,7- 23,8)	23,3 (19,3- 32,2)	17,6 (15- 22,3)	12,2 (10,7- 15,4)	11,2 (10,2- 13,6)
LC 95,00	15,7 (13,8- 18,6)	19,3 (16,2- 22,4)	28,0 (22,4- 33,6)	20,6 (17,2- 24,0)	13,7 (11,8- 15,6)	12,1 (10,9- 13,3)

	18,9)	29,3)	41,9)	27,3)	18,3)	15,7)
LC 99,00	19,6 (16,6- 25,1)	24,2 (19,0- 43,8)	39,6 (29,4- 68,9)	27,5 (21,8- 40,1)	16,9 (13,8- 25,4)	13,8 (12- 20,5)
Pendiente±SE	1,9 ± 0,72	2,29 ± 1,44	0,29 ± 0,72	0,79 ± 0,66	2,06 ± 1,2	5,4 ± 2,5
Ord. Or.±SE	-5,6 ± 0,68	-5,5 ± 1,28	-3,6 ± 0,59	-4,32 ± 0,58	-5,98 ± 1,1	-9,04 ± 2,5

La Figura 2.1 compara la toxicidad del glifosato para *H. curvispina* con otros invertebrados no blanco tomados de la literatura. Cladóceras, Amphipoda y Copépoda se encuentran entre los organismos más sensibles a la exposición a Roundup. Sin embargo, las referencias de distintos autores muestran una gran variabilidad en las LC₅₀ informadas, donde a veces se alcanza una diferencia de un orden de magnitud. Parece probable que las diferencias en las condiciones de los ensayos y los productos formulados originan la fuente de variabilidad. La LC₅₀ aparentemente inferior de *H. azteca* en relación a la de *H. curvispina*, podría ser debido al hecho de que en el presente trabajo las concentraciones letales fueron determinadas con individuos adultos, mientras que Tsui & Chu (2004) utilizaron ejemplares de 7 - 12 días de edad. Además estos autores utilizaron diferentes formulaciones (Rodeo, Roundup Biactive, and Roundup). Dentro de este contexto, la información disponible sugiere que *H. curvispina* constituye un organismo comparativamente sensible al glifosato.

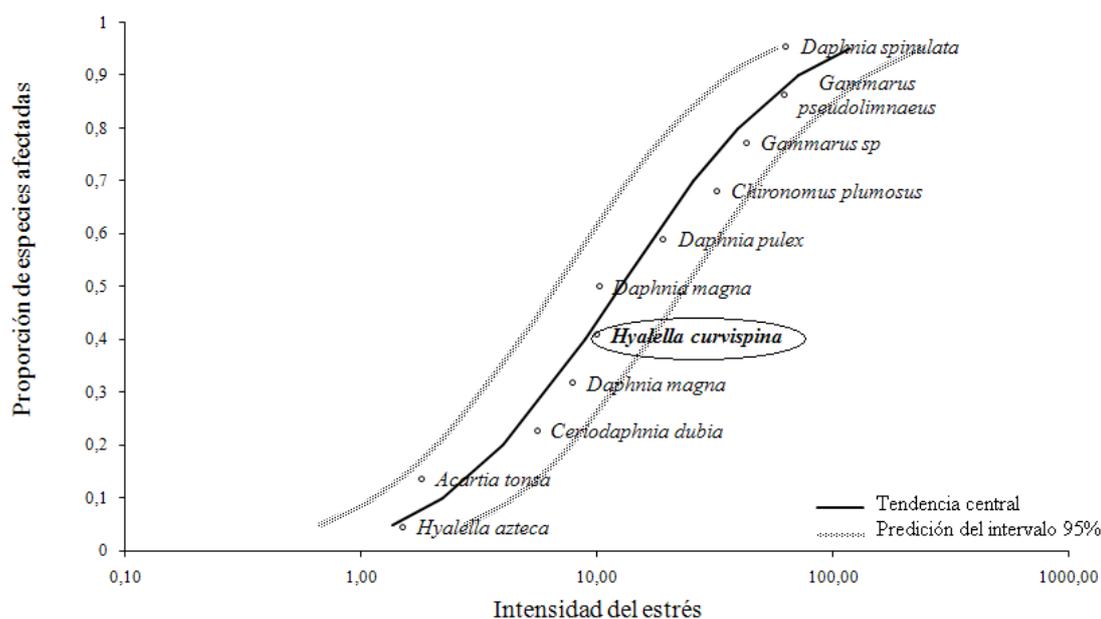


Figura 2.1. Sensibilidad de *H. curvispina* comparada con la de otros crustáceos, calculada por la distribución de sensibilidad de especies (SSDs) para glifosato usando datos de toxicidad aguda a 48 horas.

Las concentraciones de glifosato registradas en arroyos y ríos de áreas intensamente cultivadas en Argentina, se encuentran muy por debajo de las concentraciones de toxicidad aguda determinadas en los ensayos de laboratorio. Aparicio et al. (2013) registraron concentraciones de glifosato en agua de 16 sitios del Sureste de la Provincia de Buenos Aires. Las concentraciones detectadas fueron entre 0,5 y 7,6 µg/l. Peruzzo et al. (2008) reportaron concentraciones de glifosato medidas en 4 muestreos de un arroyo de primer orden y 4 ríos del Noreste de Buenos Aires. Las concentraciones máximas en agua fueron de 0,7 mg/l. Lupi et al. (2015) registraron bajas concentraciones de glifosato (ND – 0,5 ng/ml) en arroyos cultivados en la región Pampeana.

El HQ estimado con la máxima concentración en la zona de estudio por Peruzzo et al. 2008 (0,7 mg/l) y la LC₅₀ estimada (9,9 mg/l) resultó comparativamente baja (0,07 mg/l), lo que sugiere un bajo riesgo del glifosato para *H. curvispina* en los arroyos Pampeanos. El HQ estimado sigue siendo bajo (0,16) incluso si la concentración letal al 1% es usada para el cálculo. Si bien estos resultados indicarían un bajo riesgo de toxicidad aguda en *H. curvispina*, existen trabajos con otros organismos donde se detectaron efectos subletales a muy bajas concentraciones de exposición. Montagna & Collins (2004) evaluaron efectos en el consumo de oxígeno y sobre el crecimiento y comportamiento de cangrejo *Trichodactylus borellianus* producidos por distintas concentraciones del formulado Roundup. LC₅₀ calculada fue de 0,14 mg/l. El consumo de oxígeno no difirió entre los tratamientos. A diferencia de los resultados de la presente tesis los autores muestran que la exposición de los cangrejos a concentraciones muy inferiores al valor de la LC₅₀ causa efectos en el crecimiento de los ejemplares interrumpiendo el ciclo de ecdisis provocando la muerte al no poder mudar. Tate et al. (1997) determinaron los efectos subletales de glifosato en el desarrollo y la supervivencia de *Pseudosuccinea columela* (caracol huésped intermediario de *Fasciola hepatica*). Expusieron tres generaciones sucesivas de los caracoles en diferentes concentraciones (0,1 a 10 mg/l) de glifosato. El glifosato tuvo poco efecto en la primera y segunda generación. Sin embargo, los embriones de la tercera generación expuestos a 1,0 mg/l de glifosato se desarrollaron mucho más rápido que los otros. La eclosión se

inhibió en 10 mg/l y ligeramente en 0,1 mg/l. La capacidad de puesta de los huevos se incrementó en caracoles expuestos a 0,1 y 10 mg/l. Los autores observaron anomalías y poliembrionía en los caracoles expuestos a 0,1 y 10 mg/l. En este trabajo los autores también observaron efectos subletales a bajas concentraciones. Sus resultados indican que el glifosato no solo afecta la reproducción y desarrollo del caracol, si no que a su vez, podría tener un efecto sobre la dinámica poblacional de *F. hepatica*, que implicaría un aumento de infecciones.

Endosulfan

Los valores promedio de LC₅₀ y el límite de confianza del 95% fueron de 16,4 (15,1 – 17,7) µg/l. No se observó mortalidad en los controles. Los valores promedio de LC50 y el límite de confianza del 95 % del formulado Master fueron de 11,6 (10,4 – 12,4) µg/l.

Tabla 2.2. Toxicidad aguda del endosulfan para el anfípodo *H. curvispina* (µg/l), y límite de confianza del 95%.

	Septiembre 2011	Abril 2011	Marzo 2012
LC 1,0	6,3 (3,5-8,5)	5,4 (2,8-7,6)	5,7 (4,4-6,7)
LC 5,0	8,6 (5,5-10,9)	8,2 (5,2-10,2)	7,1 (5,8-7,9)
LC 10,0	10,1 (6,9-12,4)	10,1 (7,2-12,1)	7,8 (6,6-8,7)
LC 15,00	11,3 (8,2-13,5)	11,6 (8,9-13,6)	8,3 (7,3-9,3)
LC 50,00	18,1 (15,6-20,4)	21,2 (18,6-26)	11,4 (10,4-12,4)
LC 85,00	29,1 (25,4-36,3)	38,8 (30,2-64,4)	15,3 (13,9-17,8)
LC 90,00	32,6 (27,9-42,5)	44,7 (33,6-80,4)	16,5 (14,8-19,5)
LC 95,00	38,5 (31,9-53,9)	55,2 (39,4-111,8)	18,4 (16,2-22,4)
LC 99,00	52,3 (40,8-84,7)	82 (52,9-208)	22,4 (19,1-29,2)
Pendiente±SE	5,0±0,83 (3,4-6,7)	3,9±0,74 (2,5-5,4)	7,9±1,1 (5,8-9,9)
Ord, Orig,±SE	-1,3 ±1,1 (-3,5-0,8)	-0,3 ±0,9 (-2,1-1,5)	-3,3 ±1,1 (-5,5- -1,1)

En la Figura 2.2 se observa la curva de la distribución de sensibilidad de especies generada para endosulfan, donde se utilizaron datos de 30 especies de crustáceos. En ella puede observarse que *H. curvispina* resultó menos sensible que el 57% del total de las especies informadas.

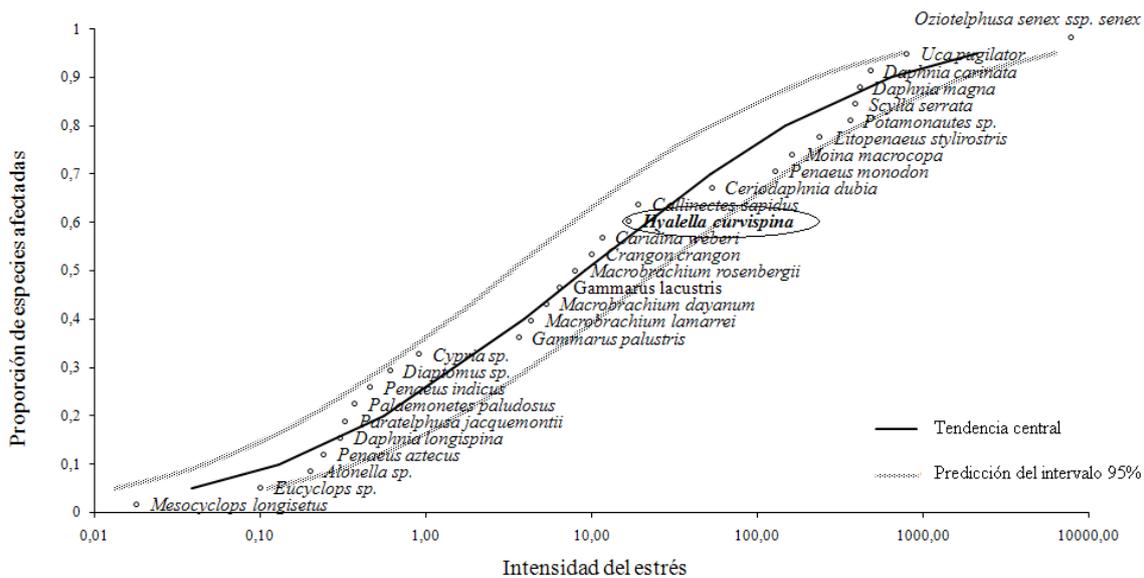


Figura 2.2. Sensibilidad de *H. curvispina* comparada con la de otros crustáceos, calculada por la distribución de sensibilidad de especies (SSDs) para endosulfan usando datos de toxicidad aguda para 48 horas.

Existen varios trabajos que reportan concentraciones de endosulfan en el ambiente. Schulz et al. (2001) reportaron concentraciones en agua de 8,5 – 12,3 $\mu\text{g/l}$ en pequeños arroyos tributarios del Río Loureus que drenan áreas de huertas frutales en Sudáfrica. Wan et al. (1995) registraron elevadas concentraciones en cuencas cultivadas en Columbia Británica, Canadá hasta 13,4 $\mu\text{g/l}$ y Muschal (1998) en el Río Gwydir, Sudeste de Australia, hasta 4 $\mu\text{g/l}$. Para nuestro medio Mugni et al. (2011) registraron una alta concentración (38 $\mu\text{g/l}$) en coincidencia con la primera lluvia después de la aplicación en un arroyo de primer orden que atraviesa un campo cultivado, tomando este valor y la LC_{50} estimada para *H. curvispina* en el presente trabajo (16,4 $\mu\text{g/l}$), el valor de HQ calculado resulta elevado (2,3) el cual sugiere un importante riesgo para la biota.

Clorpirifos

El valor medio de LC_{50} y el límite de confianza del 95% fueron de 0,38 (0,32 – 0,60) $\mu\text{g/l}$. Los valores promedio de LC_{50} y el límite de confianza del 95 % del formulado Terfos fue de 0,4 (0,36-0,46) $\mu\text{g/l}$.

Tabla 2.3. Toxicidad aguda de clorpirifos para el anfípodo *H. curvispina* ($\mu\text{g/l}$), y límite de confianza del 95%.

	Septiembre 2011	Marzo 2012	Febrero 2013
LC 1,0	0,045 (0,02-0,08)	0,17 (0,12-0,20)	0,11 (0,03-0,16)
LC 5,0	0,09 (0,04-0,12)	0,20 (0,16-0,23)	0,16 (0,08-0,20)
LC 10,0	0,12 (0,07-0,16)	0,23 (0,19-0,25)	0,20 (0,12-0,23)
LC 15,00	0,15 (0,10-0,20)	0,25 (0,21-0,27)	0,23 (0,16-0,26)
LC 50,00	0,41 (0,32-0,56)	0,32 (0,30-0,36)	0,39 (0,34-0,60)
LC 85,00	1,09 (0,74-2,23)	0,44 (0,40-0,50)	0,70 (0,50-2,02)
LC 90,00	1,37 (0,89-3,13)	0,47 (0,42-0,56)	0,80 (0,55-2,70)
LC 95,00	1,93 (1,15-5,20)	0,52 (0,45-0,64)	0,98 (0,63-4,17)
LC 99,00	3,69 (1,89-13,50)	0,62 (0,53-0,83)	1,41 (0,80-9,38)
Pendiente \pm SE	2,44 \pm 0,25	8,41 \pm 1,31	4,23 \pm 1,17
Ord, Orig, \pm SE	-5,95 (0,26)	-9,07 \pm 0,65	-6,69 \pm 0,63

La Figura 2.3 muestra la curva de sensibilidad de especies (SSDs) para clorpirifos, en ella se observa que *Hyaella curvispina* es más sensible que el 59% de las especies informadas. Para nuestra región existen varios autores que detectaron clorpirifos en el ambiente tales como Jergentz et al. (2005) quienes reportaron pulsos de concentración de 0,45 $\mu\text{g/l}$ en un arroyo de primer orden en Arrecifes, Argentina. Asimismo Marino & Ronco (2005) monitorearon las concentraciones de biocidas en un curso de agua de primer orden del sistema Pergamino – Arrecifes. Los autores determinaron concentraciones de clorpirifos entre 0,4 – 10,8 $\mu\text{g/l}$. Por otro lado, Mugni et al. (2010) simularon aplicaciones de clorpirifos para evaluar la persistencia de toxicidad en *H. curvispina*. Media hora después de la aplicación, las concentraciones medidas en agua fueron de 0,12 $\mu\text{g/l}$ y después de 24 horas la concentración disminuyó por debajo del límite de detección. Utilizando la concentración máxima de clorpirifos reportada en arroyos pampeanos (10,8 $\mu\text{g/l}$) y la LC_{50} estimada en *H. curvispina* en el presente trabajo (0,38 $\mu\text{g/l}$) el valor estimado de HQ resultó elevada (28,42) sugiriendo un importante riesgo para la biota.

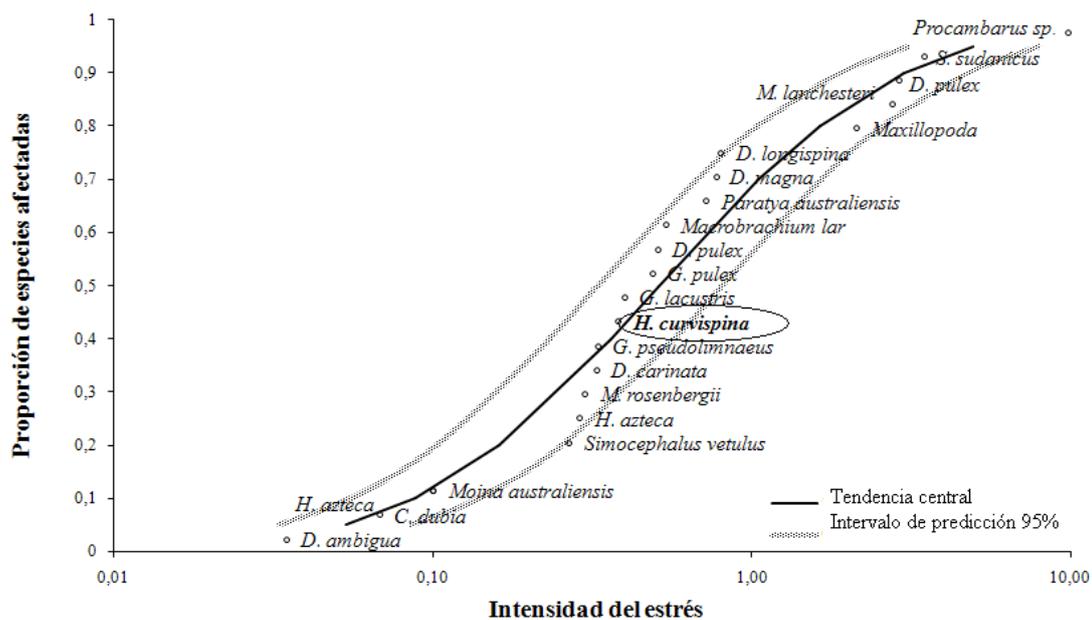


Figura 2.3. Sensibilidad de *H. curvispina* comparada con la de otros crustáceos, calculada por la distribución de sensibilidad de especies (SSDs) para clorpirifos usando datos de toxicidad aguda para 48 horas.

Cipermetrina

En la Figura 2.4 se muestra la curva de sensibilidad de especies (SSDs) para cipermetrina, la cual fue realizada en base a los datos de diferentes especies de invertebrados y el informado por Mugni et al. (2013), quienes estimaron la $LC_{50} - 48$ horas en un valor medio de $0,065 \pm 0,03 \mu\text{g/l}$. En ella también se observa que *Hyaella curvispina* mostró mayor sensibilidad que el 70% de las especies informadas.

Para nuestra región varios autores reportaron concentraciones de cipermetrina en el ambiente. Como ejemplo puede citarse a Jergentz et al. (2005) quienes detectaron concentraciones de cipermetrina que oscilan entre $0,005 - 0,71 \mu\text{g/l}$ en arroyos de primer orden que atraviesan parcelas cultivadas con soja en coincidencia con eventos de lluvia. Asimismo Marino y Ronco (2005) informaron concentraciones de $0,2 - 3,6 \mu\text{g/l}$ de cipermetrina en varios monitoreos después de eventos de lluvia en arroyos y ríos de áreas intensamente cultivadas en Buenos Aires, Argentina. Utilizando la concentración máxima de cipermetrina reportada para arroyos pampeanos ($0,71 \mu\text{g/l}$, Jergentz et al. 2005) y el valor de LC_{50} estimada para *H. curvispina* ($0,065 \mu\text{g/l}$, Mugni et al. 2013) el valor estimado de HQ es de 10,92, el cual sugiere un alto riesgo para la biota. Esto es

coincidentes con lo observado por otros autores, quienes reportan sobre los efectos tóxicos sobre los organismos. Farmen et al. (1995) y Laskowski (2002) sugieren que los anfípodos son los organismos más sensibles a la cipermetrina. De igual forma, en la presente tesis, las dosis letales de cipermetrina para *Hyaella* fueron órdenes de magnitud menores que los demás biocidas. Por su parte Giddings et al. (2001) realizaron estudios en mesocosmos sobre los efectos tóxicos de la cipermetrina en el ensamble de macroinvertebrados y calificaron la sensibilidad de los distintos organismos, ubicando a los anfípodos entre las especies más sensibles. Finalmente puede citarse a Friberg-Jensen et al. (2003) quienes examinaron los efectos de la exposición de cipermetrina en una comunidad ubicada en recintos in situ en el lago eutrófico Frederiksborg Slotssø, Dinamarca. Ellos, al igual que en el presente trabajo de tesis, calificaron a los crustáceos como organismos sensibles a la cipermetrina. Consistentemente con los resultados de la presente tesis no se observan o se detectan comparativamente bajas densidades de anfípodos de la familia Hyalellidae en los sitios adyacentes a parcelas cultivadas donde se detectó la presencia de agrotóxicos.

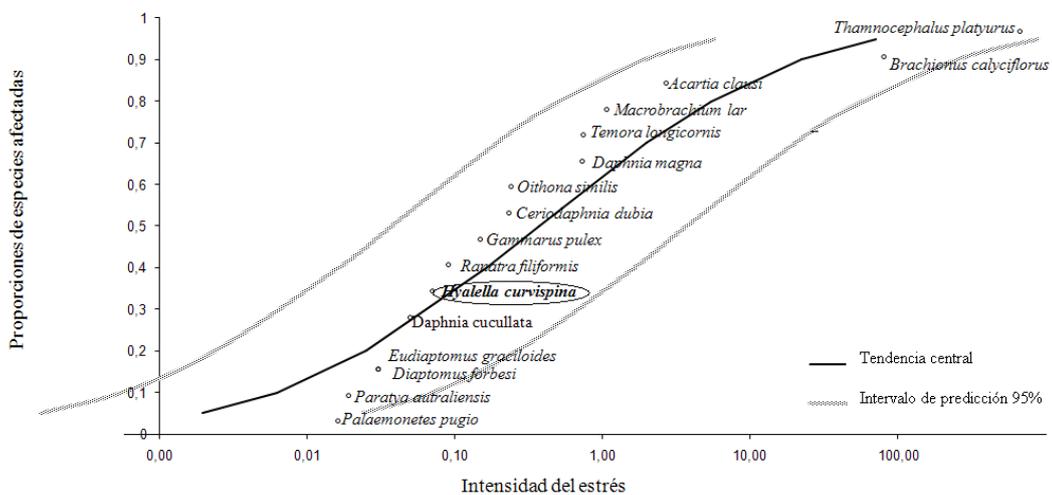


Figura 2.4. Sensibilidad de *H. curvispina* comparada con la de otras especies, calculada por la distribución de sensibilidad de especies (SSDs) para cipermetrina usando datos de toxicidad aguda para 48 horas.

Comparación de las $LC_{50} - 48\text{ hs}$

Resulta de interés comparar las dosis letales y los cocientes de riesgo (HQ) de los agrotóxicos más utilizados en nuestro medio para inferir aquellos cuyo efecto en los

ensambles será mayor. Para cada agrotóxico los distintos formulados tendrán toxicidad diferencial porque incluyen coadyuvantes que se incorporan al producto comercial para hacerlos más eficientes. Eventualmente, puede haber diferencias en la toxicidad entre los distintos productos comerciales. Se eligieron para los ensayos productos de uso difundido en la zona de estudio. El impacto ambiental es, no obstante, difícil de evaluar debido no solo a las limitaciones antes señaladas sino también al hecho que los productores a menudo utilizan mezclas de biocidas que interaccionan entre sí modificando su toxicidad.

Los valores de $LC_{50} - 48hs$ para los biocidas ensayados con *H. curvispina* variaron entre 0,07 $\mu g/l$ para cipermetrina y 8,1 mg/l para el glifosato; resultando significativamente distintos entre sí. Cipermetrina fue el biocida más tóxico para *H. curvispina* con un valor de $LC_{50} - 48hs$ promedio de 0,066 ($\pm 0,03$) $\mu g/l$; seguida por clorpirifos con un valor de $LC_{50} - 48hs$ promedio de 0,38 ($\pm 0,05$) $\mu g/l$. En cuanto al endosulfan, este resultó ser el biocida menos tóxico con una $LC_{50} - 48hs$ promedio de 16,8 ($\pm 4,4$) $\mu g/l$.

El herbicida glifosato Rundup full II de Monsanto resultó el menos tóxico de todos los biocidas ensayados con un valor de $LC_{50} - 48hs$ promedio de 8,1 ($\pm 0,4$) mg/l , órdenes de magnitud mayor de los biocidas.

Cipermetrina representa el biocida más tóxico para Hyalellidae, los análisis de riesgo HQ sugieren que de los biocidas más comúnmente empleados en la región, cipermetrina es el que representa un riesgo mayor para Hyalellidae, registrándose en el ambiente concentraciones mayores que las letales, consistentes con su ausencia o presencia en muy baja abundancia en los arroyos de cuencas agrícolas reiteradamente observada en el presente trabajo. Endosulfan o endosulfan sulfato suelen determinarse en concentraciones mayores en los sedimentos producto de su mayor persistencia en el ambiente; no obstante, la relación entre las concentraciones determinadas y la dosis letal indican que representa un riesgo comparativamente menor para Hyalellidae.

ENSAYOS SUBLETALES

DISEÑO EXPERIMENTAL

ENSAYO DE TOXICIDAD I: Simulación de un pulso de toxicidad

Veinte individuos de *H. curvispina* se colocaron en 2 litros de agua de clorinada y fueron expuestos al formulado Galgotrin con ingrediente activo de cipermetrina en 3 concentraciones distintas de 0,01; 0,1 y 1 $\mu\text{g/l}$, durante una hora, simulando un pulso de toxicidad. Transcurrido este tiempo cada uno de los tratamientos fueron traspasados a 2 litros de agua de clorinada libre de biocida. El control y los tratamientos se realizaron por triplicado (Figura 2.5). En este ensayo se evaluó supervivencia, reproducción y comportamiento. El experimento duró 30 días, durante los cuales se hicieron dos aplicaciones a intervalos de 15 días.

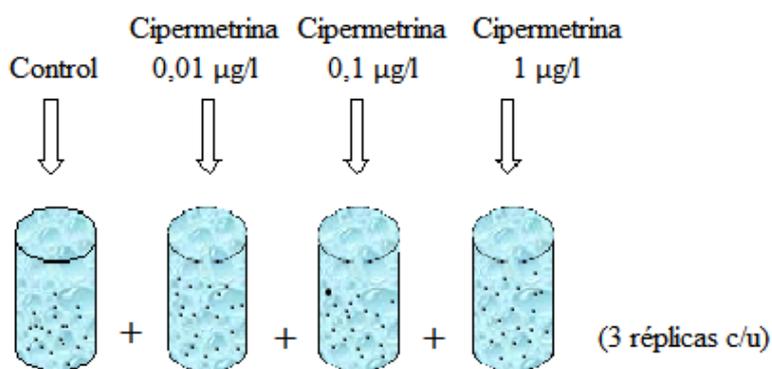


Figura 2.5. Diseño experimental de ensayo subletal con *H. curvispina*.

Durante el tiempo que transcurrió el ensayo se les agregó alimento *ad libitum* (hojas de lechuga). El oxígeno disuelto se controló tres veces por semana manteniéndose entre 7 - 8 mg/l. La temperatura del agua se mantuvo en $22\pm 1^\circ\text{C}$, el pH en torno a 7,5 y la conductividad alrededor de los 700 $\mu\text{S/cm}$; estas condiciones se mantuvieron hasta el final.

Los datos fueron analizados mediante el análisis de varianza ANOVA. Previo al análisis se probaron los supuestos estadísticos de homogeneidad de la varianza y normalidad. En los casos en que los supuestos no se cumplieron se aplicó el método de Kruskal Wallis (ANOVA no paramétrico por rangos). Asimismo cuando se detectaron

diferencias significativas ($p < 0,05$) se procedió con la comparación de medias para determinar diferencias por el método de comparación múltiple entre medias.

ENSAYO DE TOXICIDAD II: efectos en la formación de amplexos

Durante el desarrollo de este ensayo se estudiaron los efectos de exposiciones breves a distintas concentraciones de cipermetrina sobre parejas de *H. curvispina* en amplexo. Cada tratamiento fue expuesto durante una hora en el agua con el biocida, transcurrido ese tiempo se traspasaron a frascos que solo contenían agua de clorinada y se les agregó alimento *ad libitum* (hojas de lechuga). Las concentraciones de cipermetrina fueron de 0,01; 0,1 y 1 $\mu\text{g/l}$ en 200 ml de agua. Para llevar a cabo dicho ensayo se utilizó el formulado comercial Galgotrin. Además se hicieron 10 réplicas de cada tratamiento y controles (Figura 2.6). El ensayo duró 45 días.

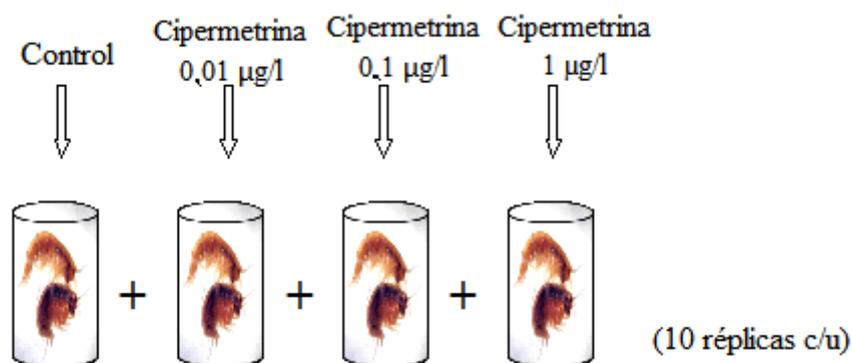


Figura 2.6. Diseño experimental de ensayo subletal con *H. curvispina*.

El oxígeno disuelto se controló tres veces por semana, manteniéndose en 7,5 y 8,3 mg/l; equivalente a un porcentaje de saturación mayor al 85%. La temperatura del agua se mantuvo en $22 \pm 1^\circ\text{C}$, el pH varió entre $7,9 \pm 0,4$ y la conductividad se mantuvo alrededor de los 700 $\mu\text{S/cm}$; estas condiciones se mantuvieron hasta finalizar el ensayo.

Para verificar diferencias entre tratamientos se realizó un análisis de varianza ANOVA. Previo al análisis se probaron los supuestos estadísticos de homogeneidad de la varianza y normalidad. En los casos en que los supuestos no se cumplieron se aplicó el método de Kruskal Wallis (ANOVA no paramétrico por rangos). Cuando se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) se procedió con la comparación de

medias para determinar diferencias por el método de comparación múltiple entre medias.

ENSAYO DE TOXICIDAD III: Simulación de un evento de escorrentía

Para simular un evento de escorrentía superficial se prepararon suspensiones. Cada una de estas contenían 1 litro de agua dechlorinada, con 10 g de sedimento extraído del sitio Confluencia y la concentración de biocida comercial con ingrediente activo de cipermetrina (Galgotrin) correspondiente. Esta suspensión se agregó a un litro de agua simulando un evento de escorrentía y al minuto se colocaron 20 individuos de *H. curvispina* en cada uno de los tratamientos con el mayor cuidado posible para evitar que los individuos se estresen. Los organismos se mantuvieron durante todo el período en que transcurrió el ensayo en la misma agua con sedimento y cipermetrina. Durante este ensayo se realizaron un control y 3 concentraciones de cipermetrina de 0,1; 1 y 2 $\mu\text{g/l}$ por triplicado (Figura 2.7). Se evaluó supervivencia, reproducción y comportamiento. El experimento duro 30 días, durante los cuales se hicieron 2 aplicaciones a intervalos de 15 días.

Durante el tiempo que transcurrió el ensayo se les agrego alimento *ad libitum* (hojas de lechuga). El oxígeno disuelto se controló tres veces por semana manteniéndose entre 7 - 8 mg/l. La temperatura del agua se mantuvo en $22\pm 1^\circ\text{C}$, el pH en torno a 7,5 y la conductividad alrededor de los 700 $\mu\text{S/cm}$; estas condiciones se mantuvieron hasta el final.

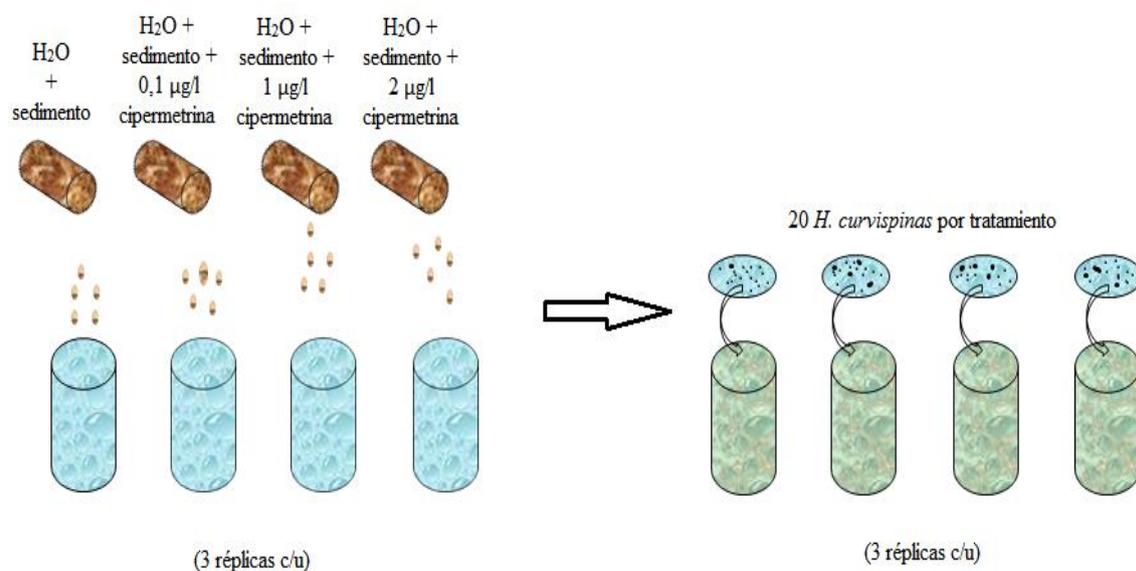


Figura 2.7. Diseño experimental de ensayo subletal con *H. curvispina*.

Los datos fueron analizados mediante el análisis de varianza ANOVA. Previo al análisis se probaron los supuestos estadísticos de homogeneidad de la varianza y normalidad. En los casos en que los supuestos no se cumplieron se aplicó el método de Kruskal Wallis (ANOVA no paramétrico por rangos). Cuando se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) se procedió con la comparación de medias para determinar diferencias por el método de comparación múltiple entre medias.

RESULTADOS

ENSAYO DE TOXICIDAD I: Simulación de un pulso de toxicidad

Durante la exposición se observó que a medida que transcurría el tiempo de exposición los individuos empezaban a tener movimientos rápidos, espasmódicos y erráticos los cuales aumentaban en relación al aumento de la concentración a la cual fueron expuestos y al tiempo de exposición. En las concentraciones más altas, los individuos no evidenciaban ninguna actividad, permaneciendo en el fondo del recipiente con su parte ventral hacia arriba, moviendo solo las extremidades, dejando de tener movimiento de natación en la columna de agua. Estos síntomas fueron revertidos una vez cesada la exposición.

A los 15 días no se registraron diferencias significativas en la mortalidad posterior entre los tratamientos y los controles. A los 15 días con posterioridad a la segunda aplicación, se registraron diferencias significativas en la supervivencia media de los controles (15 ± 2 individuos), los cuales resultaron significativamente mayores ($p=0,012$) que los tratamientos expuesto a $1 \mu\text{g/l}$ de cipermetrina (8 ± 1 individuos).

ENSAYO DE TOXICIDAD II: efectos en la formación de amplexos

Durante la exposición en los controles y en la concentración más baja del biocida ($0,01 \mu\text{g/l}$) el 100% de las parejas se mantuvieron en amplexo, mientras que en la exposición de $0,1 \mu\text{g/l}$ el 40% de las parejas se separaron y en la de $1 \mu\text{g/l}$ el 80% se separó, resultando la concentración de $1 \mu\text{g/l}$ significativamente distinta de las demás en relación a la cantidad de amplexos (ANOVA $p < 0,05$).

A medida que transcurría el tiempo de exposición los individuos empezaban a tener movimientos de nado más rápidos, espasmódicos y erráticos, los cuales aumentaban con la concentración a la cual fueron expuestos. Antes de transcurrido el tiempo de exposición los individuos de las concentraciones más altas dejaron de tener movimientos natatorios y quedaron en el fondo del recipiente con su parte ventral hacia arriba y solo movían las extremidades, síntomas que se revirtieron poco después que cesó la exposición.

A las 24 h con posterioridad a la exposición, en los controles, el 80 % permanecía en amplexo, observándose la presencia de huevos en las hembras que interrumpieron el amplexo. En las exposiciones el 50% de las hembras permanecía en amplexo y no se observaron hembras con huevos.

Al finalizar el experimento (a los 45 días) no existieron diferencias significativas en el tiempo en que comenzaron a aparecer crías, ni en el número de crías nacidas. De las crías nacidas en los controles se observó que el 20% formó amplexos, mientras que el 14 % de las crías nacidas en los tratamientos expuestos a 0,01 y solo el 0,04 y 0,05 en los tratamientos expuestos a 0,1 y 1 $\mu\text{g/l}$ formaron amplexos.

ENSAYO DE TOXICIDAD III: Simulación de un evento de escorrentía

A los 15 días se observaron diferencias significativas ($p < 0,01$) en la supervivencia media entre los controles (19 ± 1 individuos) y los tratamientos (12 ± 5 ; 11 ± 3 ; 6 ± 2 individuos, para las exposiciones de 0,1 1 y 2 $\mu\text{g/l}$ de cipermetrina respectivamente). En cuanto a efectos subletales en la reproducción, no fueron evidenciados. A los 30 días no se observaron diferencias significativas en la supervivencia.

DISCUSIÓN

En el ensayo de toxicidad I los organismos expuestos a concentraciones mayores a las dosis letales revierten su comportamiento y sobreviven por períodos prolongados si la exposición es comparativamente breve, de una hora de duración, período ambientalmente más realista ya que los pulsos de exposición en el campo son generalmente efímeros y están relacionados con eventos de escorrentía superficial. No obstante, el experimento muestra que si bien la primera exposición no produce

mortalidad, tiene un efecto posterior afectando la supervivencia de una segunda exposición. Este efecto puede potencialmente tener influencia en la fauna de un arroyo que recibe varios pulsos de toxicidad producidas por sucesivas lluvias posteriores a las aplicaciones en los cultivos adyacentes.

En el segundo ensayo donde se estudio el efecto en la formación de amplexos, se observó que la exposición produce efectos en la descendencia, registrándose menor proporción en la formación de amplexos en la generación siguiente, sugiriendo un efecto en la reproducción que probablemente tenga consecuencias en la densidad en un período posterior a la exposición. Los resultados obtenidos son consistentes con otros trabajos donde observaron distintos efectos subletales en organismos expuestos a diferentes biocidas. Así, Liess (1994) expuso larvas de Trichoptera a concentraciones subletales de fenvalerato (de 0,001 ppb – 10 ppb) durante 1 hora para ver patrones de emergencia de las larvas. El autor observó que las larvas expuestas mostraron un retraso en la emergencia durante el período inicial, y al final del período ensayado observó una acelerada emergencia. Asimismo Negro et al. (2015) evaluaron el efecto de distintas concentraciones de clorpirifos (48, 240 y 1200 ng/l) y endosulfan (100, 200 y 400 ng/l) en concentraciones ambientalmente realistas sobre el período de incubación, eclosión y supervivencia de embriones y neonatos del cangrejo *Zilchiopsis collastinensis*. La exposición tuvo lugar hasta que los animales murieron o entraron en el primer ciclo de muda después de la eclosión. Los autores observaron que la exposición no causó diferencias en el período de incubación ni eclosión, pero vieron que disminuyó la supervivencia de los recién nacido. También Pedersen et al. (2013) expusieron *H. azteca* a un pulso de toxicidad de diferentes concentraciones de permetrina (0; 0,3; 0,9; 2,7 µg/l) y observaron su comportamiento durante 56 días. Durante la exposición observaron los amplexos y posteriormente la supervivencia y reproducción. Vieron que todas las parejas expuestas a permetrina se separaron durante la exposición y poco después no registraron actividad; la cual recuperaron después de la transferencia al agua limpia. El tiempo para volver a formar amplexos fue significativamente menor en el control. El número total de juveniles producidos fue significativamente mayor en los controles. En otro trabajo, Collins & Cappelo (2006) evaluaron el efecto de la cipermetrina sobre el camarón *Palaemonetes argentinus* y calcularon su LC₅₀. Analizaron los cambios en el comportamiento (a concentraciones de 0,0002; 0,0025; 0,0250 µg/l cipermetrina) y crecimiento (concentraciones de 0,0001; 0,001; 0,01 µg/l de cipermetrina) y en una única aplicación (0,0001; 0,001 y 0,01 µg/l) por medio de la

generación de un flujo continuo durante 1 día. La exposición duró 45 días. LC_{50} fue de 0,0031 μ g/l para 24 h y 0,0020 μ g/l para 96 h. Vieron que el efecto conductual fue la hiperactividad, la cual aumentaba con el aumento de la concentración. Observaron que el período de intermuda fue 246 % mayor que en el grupo control. Además la mortalidad, después del primer ciclo de ecdisis fue del 100% en todos los tratamientos expuestos. Una única aplicación provocó una elevada mortalidad después de 50 días. Los autores concluyen que bajas concentraciones del biocida afectaron la supervivencia y alteraron el ciclo de actividad metabólica, de comportamiento y ecdisis.

En el ensayo III, donde se simularon eventos de escorrentía y los individuos se mantuvieron durante todo el ensayo en el agua con sedimento y biocida, se observaron cambios significativos en la supervivencia solamente durante la primera aplicación. Existen evidencias que dan cuenta del efecto de degradación a causa de la actividad bacteriana. Como ejemplo podemos citar a Fang et al. (2008) quienes vieron que repetidas aplicaciones de biocidas aumentan la tasa de degradación por actividad bacteriana, mientras que su efecto inhibitor sobre las comunidades microbianas del suelo disminuyó gradualmente con la frecuencia de aplicación. Las bacterias encontradas eran capaces de utilizar el biocida como una fuente de carbono y energía, indicando que la capacidad de los microorganismos del suelo para degradar clorpirifos se formó durante el experimento. Por otra parte Pankaj et al. (2015) aislaron *Bacillus* sp, de suelos contaminados con cipermetrina de un campo de arroz de la India. Observaron que las bacterias degradan hasta un 81.6 % del biocida dentro de los 15 días en condiciones de crecimiento normales.

La dosis letal 50% de cipermetrina para *H. curvispina* informada anteriormente en esta tesis, se determinó siguiendo procedimientos estándares de la APHA, en exposiciones de 48 hs, utilizando agua sintética moderadamente dura. En esas condiciones una exposición a 0,06 μ g/l de cipermetrina produce una mortalidad del 50% de la población. Por el contrario, si la exposición se hace en presencia de sólidos suspendidos en cantidades análogas a las de la escorrentía superficial (Mugni 2009), en la exposición a 1 μ g/l, (16 veces mayor a la LC_{50} - 48h) y una exposición de 15 días, (7,5 veces mayor que la LC_{50} - 48 hs) la supervivencia alcanzó el 30% de la observada en los controles. La exposición a 1 μ g/l correspondió aproximadamente a la $LC_{95\%}$ -48 h (tabla 2.3). Asimismo, una exposición a 0,1 μ g/l (1,6 veces mayor que la LC_{50} - 48h), durante 15 días, produjo una supervivencia de 57% del control, sugiriendo que el efecto

de los biocidas en condiciones ambientalmente realistas puede diferir considerablemente de las incubaciones siguiendo protocolos estándar y enfatizando la necesidad de tomar con cautela las extrapolaciones ambientales de los ensayos de laboratorio.

IV

Conclusiones

En el presente trabajo se llevó a cabo un importante esfuerzo de muestreo en el ambiente; se tomaron muestras en 11 sitios de 9 arroyos durante 3 años consecutivos. La información disponible permitió confirmar la hipótesis planteada: el uso del suelo en la cuenca influye en la composición del ensamble de macroinvertebrados de los arroyos estudiados.

La concentración de agrotóxicos y nutrientes fue mayor en sitios adyacentes a cultivos, y la estructura del ensamble de macroinvertebrados de estos sitios, resultó distinta a la de sitios adyacentes a parcelas con ganadería extensiva sobre pasturas naturales y a sitios localizados en una reserva de la biosfera. La información disponible evidencia que la actividad agrícola practicada en nuestro medio induce a un cambio hacia una fauna ruderal, con mayor proporción de taxones tolerantes a agrotóxicos como Planorbidae, Glossiphoniidae, Aeshnidae, Sphaeriidae y Dugesiidae y la ausencia o disminución de taxones sensibles como Hyalellidae, Chironomidae, Coenagrionidae, Caenidae y Polycentropodidae. Estos taxones son sugeridos como buenos candidatos para ser utilizados como indicadores regionales de contaminación por agrotóxicos.

Entre los taxones que están representados en menor abundancia en los sitios agrícolas se profundizó el estudio de Hyalellidae. La dosis letal de los biocidas más comunes utilizados en la región fue determinada. *Hyalella curvispina* resultó sensible a los agrotóxicos y adecuada para su utilización como un organismo modelo en investigaciones para evaluar el impacto ambiental ocasionado por el uso de biocidas. Se compararon las dosis letales con concentraciones registradas en los ambientes regionales informadas en la literatura, resultando en ocasiones que las concentraciones de cipermetrina, endosulfan, y clorpirifos superaron las dosis letales, indicando una relación causa efecto entre las concentraciones de los biocidas determinadas y la disminución en la abundancia o ausencia de *Hyalella sp.* en los sitios agrícolas. El herbicida glifosato registró concentraciones muy por debajo de las dosis letales determinadas indicando comparativamente menor riesgo de toxicidad aguda.

La posibilidad de tomar una muestra durante los eventos de escorrentía y determinar la concentración de agrotóxicos en esos episodios es remota. Los biocidas utilizados en nuestro medio son hidrofóbicos, se adsorben a los sedimentos y su permanencia en este compartimento es comparativamente más prolongada, por lo que resulta mejor analizar muestras de sedimentos que de aguas. No obstante, la interpretación de la información disponible debe tener presente que la exposición en el momento de la escorrentía es siempre mayor que la determinada en el momento que se

tomó la muestra. Más aún, los ensayos de laboratorio desarrollados en este trabajo muestran que la exposición a concentraciones menores a las letales causa efectos posteriores, por ejemplo en la reproducción, con consecuencias cuyo efecto en la población es consistente con la observada disminución en la abundancia de los taxones sensibles en los sitios contaminados.

Se evidenció la relación entre la cobertura y tipo de vegetación y el ensamble de macroinvertebrados en los sitios de ganadería extensiva y de reserva. A menudo los productores drenan las zonas bajas y los humedales asociados a los cauces para aumentar la superficie cultivada, cavando zanjas y rectificando los cauces preexistentes. Seguramente la destrucción del hábitat aguas arriba del sitio de muestreo tiene un efecto que se superpone al de la toxicidad de los agrotóxicos en los arroyos de cuencas agrícolas. En el último año se estudió un arroyo que atraviesa una parcela cultivada donde el productor dejó una franja cubierta por una pastura natural, sin cultivar, adyacente al arroyo. Este sitio registró menores concentraciones de agrotóxicos y nutrientes que su vecino Remes, donde se cultiva hasta el borde del arroyo y los ensambles de macroinvertebrados no difirieron de los sitios Morales y Destino, ubicados en la reserva. Se sugiere que mantener franjas con vegetación entre los cultivos y los arroyos representan una norma de manejo factible de ser implementada con importantes efectos en la atenuación de impacto y preservación de la fauna. Se propone realizar estudios sobre estos temas en trabajos posteriores.

Los sitios adyacentes a parcelas con actividad ganadera no representaron un grupo uniforme. En el primer año, el ensamble de Poblet e Ignacio Correa, ubicados en el mismo arroyo, resultaron significativamente distintos. Se trató de un período seco, en Poblet se concentró una elevada densidad de ganado sobre el arroyo para beber, mientras que en Ignacio Correa un alambrado separaba el ganado del arroyo manteniendo una franja de amortiguación con la pastura natural. Las concentraciones de nutrientes fueron mayores en Poblet por el aporte de las heces registrando elevadas concentraciones de amonio. El amonio se encuentra en equilibrio con el amoníaco, tóxico para la fauna, equilibrio regulado por el pH que a su vez registra variaciones diurnas regidas por la actividad fotosintética del fitoplancton. También se observó que el pisoteo del ganado en las márgenes produjo un deterioro evidente de la vegetación riparia. En los años siguientes se observó que el ensamble de Arregui, adyacente al sitio ganadero, fue similar al de Confluencia, en la reserva, ambos con dominancia de *S. californicus* y que el sitio ganadero Sin Nombre resultó similar a los sitios Destino y

Morales, en la reserva, con los que comparte una vegetación más compleja con profusión de macrófitas sumergidas y arraigadas de mayor cobertura y complejidad estructural. En Sin Nombre el ganado accedía al arroyo para beber. No obstante, la abundante vegetación amortiguó el impacto del ganado. Se concluye que la actividad ganadera sobre pasturas naturales practicada en la región, que condiciona una menor densidad de ganado que las pasturas implantadas y fertilizadas, produce escaso impacto en el ensamble de los arroyos adyacentes si se mantiene una franja de atenuación impidiendo al ganado acceder al arroyo o cuando las márgenes del arroyo cuentan con abundante vegetación riparia que amortiguan su impacto.

Se concluye que la exposición a biocidas contribuye a las diferencias observadas en la composición de los ensambles de macroinvertebrados en cuencas agrícolas, sin excluir, eventualmente, la contribución de otras causas.

Bibliografía

Adam O, Badot PM, Degiorgi F, Crini G (2009) Mixture toxicity assessment of wood preservative pesticides in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72:441-449

Aizen, MA, Harder LD (2009) The Global Stock of Domesticated Honey Bees Is Growing Slower Than Agricultural Demand for Pollination. *Current Biology* 19:915–918

Aparicio VC, De Geronimo E, Marino D, Primost J, Carriquiriborde P, Costa JL (2013) Environmental Fate of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid in Surface Waters and Soil of Agricultural Basins. *Chemosphere* 93:1866-1873

APHA (1995) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association. 19th Edition. American Public Health Association. Washington, DC.

APHA (American Public Health Association) (1998) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed. Washington, DC: American Public Health Association

APHA (2005) Standard methods for the examination of water and wastewater, 20 ed., Am. Public Health Assoc., Washington, DC.

Astoviza MJ, Cappelletti N, Bilos C, Migoya MC, Colombo JC (2015) Massive airborne Endosulfan inputs related to intensive agricultura in Argentina's Pampa. *Chemosphere* 144:1459-1466

Athor J (editor) (2009) Parque Costero del Sur – Naturaleza, conservación y patrimonio cultural. Fundación de Historia Natural “Félix de Azara”. Buenos Aires. 528 pp

Baillieul M, Blust R (1999) Analysis of the swimming velocity of cadmium-stressed *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 44:245-254

Barry MJ, Shifko A, Holdway DA (1995) Effects of Endosulfan Toxicity and food level on growth and crest morphology of *Daphnia cephalata*. Australasian Journal of Ecotoxicology 2:43-48

Barry MJ (1996) Effects of an Organochlorine Pesticide on Different Levels of Biological Organization in *Daphnia*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 34:239-251

Bazán JM, Alberino JC, Varriano N, Cariello J, Kruse E, Rojo A, Deluchi M, Laurencena P (2011) Cuencas del arroyo El Pescado y Del Gato en los partidos de La Plata, Berisso y Ensenada. Proyecto integrador para la mitigación de la contaminación atmosférica proyecto integrador para la determinación de la calidad del agua tercera reunión anual PROIMCA primera reunión anual PRODECA

Beketov M, Kefford BJ, Schafer RB, Liess M (2013) Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. Editorial Board 11027):11039-11043

Bereswill R, Streloke M, Schulz R (2013) Current-use pesticides in stream water and suspended particles following runoff: exposure, effects, and mitigation requirements. Environ Toxicol Chem. 32(6):1254-63. doi 10.1002/etc.2170

Bindraban PS, Franke AC, Ferraro DO, Ghera CM, Lotz LAP, Nepomuceno A, Smulders MJ, van de Wiel CM (2009) G-M related sustainability: agro ecological impacts, risks and opportunities of soy production in Argentina and Brazil. Plant Research International B.V., Wageningen. 56pp

Borgmann U, Ralph KM, Norwood WP (1989) Toxicity Test Procedures for *Hyaella azteca*, and Chronic Toxicity of Cadmium and Pentachlorophenol to *H. Azteca*, *Gammarus Fasciatus*, and *Daphnia Magna*. Archive of Environmental Contamination and Toxicology 18:756-764

Borin M, Passonia M, Thieneb M, TTempesta T (2010) Multiple functions of buffer strips in farming areas. Europ. J. Agronomy 32:103–111

Brand C & Miserendino ML (2011) Characterizing Trichoptera trophic structure in rivers under contrasting land use in Patagonia, Argentina. Zoosymposia 5:29-40

Bindraban PS, Franke AC, Ferraro DO, Ghersa CM, Lotz LAP, Nepomuceno A, Smulders MJM, van de Wiel CCM (2009) G-M related sustainability: agro ecological impacts, risks and opportunities of soy production in Argentina and Brazil. Plant Research International B.V, Wageningen, pp

Buikema AL, Niederlehner BR, Cairns J (1982) Biological monitoring: Part IV. Toxicity testing. Water Research 16:239-262

Bunzel K, Liess M, Kattwinkel M (2014) Landscape parameters driving aquatic pesticide exposure and effects. Environmental Pollution 186:90-97

CASAFE (Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes, Buenos Aires, Argentina) (2009) La Argentina 2050. La revolución tecnológica del agro. Hacia el desarrollo integral de nuestra sociedad. Dina Ricci - 1a ed. - Buenos Aires - 744 pp

CASAFE (2012) Disponible: <http://casafe.org.ar/estad/Mercado2010.htm>

Castillo LE, Martinez E, Ruepert C, Savage C, Gilek M, Pinnock M, Solis E (2006) Water quality and macroinvertebrate community response following pesticide applications in a banana plantation, Limon, Costa Rica. Sci. Total Environ. 367:418–432

Christensen BT, Lauridsen TL, Ravn HW, Bayley M (2005) A comparison of feeding efficiency and swimming ability of *Daphnia magna* exposed to cypermethrin. Aquatic Toxicology 73:210–220

CIAFA (Cámara de la Industria Argentina de Fertilizantes y Agroquímicos) (2016) (<http://www.ciafa.org.ar>) Entrada: Febrero 2016

Clarke KR, Gorley RN (2001) PRIMER version 5: User Manual/Tutorial PRIMER-E: Plymouth Routines in Multivariate Ecological Research 91 pp

Clarke KR, Warwick RM (2001) Change in Marine Communities, an approach to statistical analysis and interpretation, 2nd Edition. PRIMER-E: Plymouth Routines in Multivariate Ecological Research

Collins P & Capello S (2006) Cypermethrin Toxicity to Aquatic Life: Bioassays for the Freshwater Prawn *Palaemonetes argentinus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 51:79–85

Cortelezzi A, Ocón C, López van Oosterom MV, Cepeda R, Rodrigues Capítulo A (2015) Nutrient enrichment effect on macroinvertebrates in a lowland stream of Argentina. *Iheringia, Série Zoologia*, Porto Alegre 105:228-234

De Gerónimo E, Aparicio VC, Bárbaro S, Portocarrero R, Jaime S, Costa JL (2014) Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. *Chemosphere* 107:423–431

Demetrio PM (2012) Estudio de efectos biológicos de biocidas utilizados en cultivos de soja RR y evaluación de impactos adversos en ambientes acuáticos de agroecosistemas de la región pampeana. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas

Domínguez E & Fernández HR (1998) Calidad de los ríos de la cuenca del Salí (Tucumán, Argentina) medida por un índice biótico. Serie conservación de la naturaleza. Tomo II. Fundación Miguel Lillo Tucumán. Universidad Nacional de Tucumán

Dominguez, E., Fernandez, H.R., (Eds.), 2009. Macroinvertebrados bentónicos. Sistemática y biología. 1ª ed. Tucumán. Fundación Miguel Lillo, 656 p.

Duggan IC, Green JD, Thompson K, Shiel RJ (2001) The influence of macrophytes on the spatial distribution of littoral rotifers. *Freshwater Biology* 46:777-786

Dutra BK, Fernandes FA, Lauffer AL, Oliveira GT (2009) Carbofuran-Induced Alterations in the Energy Metabolism and Reproductive Behaviors of *Hyalella castroi* (Crustacea, Amphipoda). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 149:640-646

Egler MA, Buss DF, Moreira JC, Baptista DF (2012) Influence of agricultural land-use and pesticides on benthic macroinvertebrate assemblages in an agricultural river basin in southeast Brazil. *Braz. J. Biol.* 72:437-443

Fang H, Yu YL, Wang XG, Chu XQ, Pan XD, Yang XE (2008) Effects of repeated applications of Chlorpyrifos on its persistence and soil microbial functional diversity and development of its degradation capability. *Bull Environ Contam Toxicol.* 81:397-400

FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2016) (<http://www.fao.org/faostat/es/#compare>). Entrada: Diciembre 2016

Faria MS, Nogueira AJA, Soares AMVM (2007) The use of *Chironomus riparius* larvae to assess effects of pesticides from rice fields in adjacent freshwater ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67:218–226

Farmer D, Hill IR, Maund SJ (1995) A comparison of the fate and effects of two pyrethroid insecticides (lambda-cyhalothrin and cypermethrin) in pond mesocosms. *Ecotoxicology* 4(4):219–244

Ferreiro N, Feijoó C, Giorgi A, Rosso J (2014) Macroinvertebrates select complex macrophytes independently of their body size and fish predation risk in a Pampean stream. *Hydrobiologia* doi:10.1007/s10750-014-1953-y

Frenguelli J (1956) Rasgos generales de la hidrografía de la Provincia de Buenos Aires. *Publicaciones de LEMIT*, 62:1-19

Friberg-Jensen U, Wendt-Rasch L, Woin P, Christoffersen K (2003) Effects of the pyrethroid insecticide, cypermethrin, on a freshwater community studied under field conditions. I. Direct and indirect effects on abundance measures of organisms at different trophic levels. *Aquat. Toxicol.* 63:357–371

Gabellone N, Claps M, Solari L, Neschuk N (2005) Nutrients, conductivity and plankton in a landscape approach to a Pampean saline lowland river (Salado River, Argentina). *Biogeochemistry* 75:455–477

García ME, Rodrigues Capítulo A, Ferrari L (2010) Age-Related Differential Sensitivity to Cadmium in *Hyalella Curvispina* (Amphipoda) and Implications in Ecotoxicity Studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73:771-778

GFEA-U (2007) Endosulfan. Draft Dossier prepared in support of a proposal of endosulfan to be considered as a candidate for inclusion in the CLRTAP protocol on persistent organic pollutants. German Federal Environment Agency – Umweltbundesamt Berlin, February

https://www.unece.org/fileadmin/DAM/env/lrtap/TaskForce/popsxg/2004/Dossier_Endosulfan.2004.pdf

Giddings JM, Solomon KR, Maund SJ (2001) Probabilistic risk assessment of cotton pyrethroids. II. Aquatic mesocosm and field studies. *Environ. Toxicol. Chem.* 20(3):660–668

Giesy JP, Dobson S, Solomon KR (2000) Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Rev Environ Contam Toxicol.* 167:35–120

Gómez N, Sierra MV, Cortelezzi A, Rodrigues Capítulo A (2008) Effects of discharges from the textile industry on the biotic integrity of benthic assemblages. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69:472-479

Gualdoni CM, Duarte CA, Medeot EA (2011) Estado ecológico de dos arroyos serranos del sur de Córdoba, Argentina. *Ecología Austral* vol. 21 no 2

Hansen JP, Wikstrom SA, Axemar H, Kautsky L (2011) Distribution differences and active habitat choices of invertebrates between macrophytes of different morphological complexity. *Aquatic Ecology* 45:11-22

Hering D, Moog O, Sandin L, Verdonshot P (2004) Overview and application of the AQEM assessment system. *Hydrobiología* 516:1-20

Hickey CW (1989) Sensitivity of Four New Zealand Cladoceran Species and *Daphnia Magna* to Aquatic Toxicants. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 23:131-137

Hunt L, Bonetto C, Resh VH, Forsin Buss D, Fanelli S, Marrochi N, Lydy MJ (2016) Insecticide concentrations in stream sediments of soy production regions of South America. *Sci. Total Environ.* 547:114–124

Hurtado MA, Giménez JE, Cabral MG (Eds.) (2006) Análisis ambiental del partido de La Plata: Aportes al ordenamiento territorial. 1ª ed. Buenos Aires: Consejo Federal de Inversiones, 125pp

IARC (International Agency for Research on Cancer) (2015) (<http://www.iarc.fr/en/media-centre/iarcnews/pdf/MonographVolume112.pdf>) Entrada: Diciembre 2016

Jarvie HP, Haygarth PM, Neal C, Butler P, Smith B, Naden PS, Joynes A, Neal M, Wickham H, Armstrong L, Harman S, Palmer-Felgate E.J (2008) Stream water and quality along an upland-lowland rural land use continuum, south west England. *Jour. of Hydr.* 350:215-231

Jergentz S, Mugni H, Bonetto C, Schulz R (2004a) Runoff-related endosulfan contamination and aquatic macroinvertebrate response in rural basins near Buenos Aires, Argentina. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46(3):345-353

Jergentz S, Pessacq P, Mugni H, Bonetto C, Schulz R (2004b) Linking in situ bioassays and dynamics of macroinvertebrates to assess agricultural contamination in streams of the Argentine Pampa. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59:133-141

Jergentz S, Mugni H, Bonetto C, Schulz R (2005) Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere* 61(6):817–826

Kegley SE, Hill BR, Orme S, Choi AH (2011) PAN Pesticide Database, Pesticide Action Network, North America © 2000-2010. <http://www.pesticideinfo.org>. Entrada: Julio 2016.

Laskowski D (2002) Physical and chemical properties of pyrethroids. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 174:49–177

Lenat DR & Barbour MT (1994) Using benthic macroinvertebrate community structure for rapid, cost-effective, water quality monitoring: rapid bioassessment. En: Loeb SL & A Spacie (eds) *Biological monitoring of aquatic systems*: 187-215. Lewis Publishers, Ann Arbor, Michigan, USA

Lenat DR, Crawford JK (1994) Effects of land use on water quality and aquatic biota of three North Carolina piedmont streams. *Hydrobiología* 294:185-199

Leonard A (1997) Controls of sediment transport and deposition in an incised mainland marsh basin, southeastern North Carolina. *Wetlands* 17:263-274

Leonard A, Hyne V, Lim R, Chapman J (1999) Effect of endosulfan runoff from cotton fields on macroinvertebrates in the Namoi River. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 42:125-134

Leonard A, Hyne V, Lim R, Van der Brink PJ (2000) Riverine endosulfan concentration in the Namoi River, Australia: link to cotton field runoff and macroinvertebrate population densities. *Environ. Toxicol. Chem.* 19:1540-1551

Liess M (1994) Pesticide impact on macroinvertebrate communities of running waters in agricultural ecosystems. *Verh. Limnol.* 25:2060-2062

Liess M, Schulz R (1999) Linking insecticide contamination and population response in an agricultural stream. *Environ. Toxicol. Chem.* 18(9):1948-1955

Liess M & Von der Ohe P (2005) Analyzing effects of pesticides on invertebrate communities in streams. *Environ. Toxicol. Chem.* 24:954-965

Liess M, Schäfer RB, Schriever CA (2008) The footprint of pesticide stress in communities - Species traits reveal community effects of toxicants. *Sci. Total Environ.* 406:484-490

Lorenzen CJ (1967) Determination of chlorophyll and phaeo-pigments: spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.* 12:343

Lupi L, Miglioranza KSB, Aparicio VC, Marino D, Bedmar F, Wunderlin DA (2015) Occurrence of glyphosate and AMPA in an agricultural watershed from the southeastern region of Argentina. *Science of the Total Environment* 536:687-694

MAGPyA (Ministerio de agroindustria ganadería y pesca) (2016) (<http://www.agroindustria.gob.ar>) (http://www.siiia.gov.ar/_apps/siiia/estimaciones/estima2.php)
Entrada: Febrero 2016

Malaj E, von der Ohe P, Grote M, Kühne, Mondy CP, Usseglio-Polatera P, Brack W, Schafer RB (2014) Organic chemicals jeopardize the health of freshwater ecosystems on the continental scale. Edited by Deborah L. Swackhamer, University of Minnesota, Saint Paul, MN, and accepted by the Editorial Board 111(26):9549-9554

Marino D, Ronco A (2005) Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75(4):820-826

Martinez IL (1994) El estiércol y las prácticas agrarias respetuosas con el medio ambiente. Ministerio de Cultura, Pesca y Alimentación. Secretaria General de Estructuras Agrarias. Hojas Divulgadoras. Num. 1/94 HD.

Mazanti L, Ricec C, Bialek K, Sparling D, Stevenson C, Johnson W E, Kangas P, Rheinstejn J (2003) Aqueous-Phase Disappearance of Atrazine, Metolachlor, and Chlorpyrifos in Laboratory Aquaria and Outdoor Macrocosms. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 44: 67–76

Merritt RW & Cummins KW, Berg MB, (Eds.) (2008) An Introduction to the Aquatic Insects of North America. Dubuque, Iowa: Kendall-Hunt. 1158 pp

Miserendino ML & Pizzolon LA (2004) Interactive effects of basin features and land-use change on macroinvertebrates communities of headwater streams in the Patagonian Andes. River Res. Applic. 20:967-983

Miserendino ML, Brand C, Di Prinzio C (2008) Assessing urban impacts on water quality, benthic communities and fish in streams of the Andes Mountains, Patagonia (Argentina). Water Air and Soil pollution 194:91-110

Miserendino ML (2009) Effects of flow regulation, basin characteristics and land-use on macroinvertebrate communities in a large arid patagonian river. Biodiversity & Conservation DOI: 10.1007/s 10531-008-9565-3. 8 (7):1921– 1943

Miserendino ML, Casaux R, Archangelsky R, Yanina Di Prinzio C, Brand C, Kutschker AM (2010) Assessing land-use effects on water quality, in-stream habitat, riparian ecosystems and biodiversity in Patagonian northwest streams. Sci Total Environ. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.10.034

Montagna M & Collins P (2004) Efecto de un formulado comercial del herbicida glifosato sobre el cangrejo *Trichodactylus borellianus* (Crustacea, Decapoda: Braquiura). FABICIB 8:227-234

Mugni H (2009) Concentración de nutrientes y toxicidad de biocidas en aguas superficiales de cuencas rurales. Tesis doctoral, Universidad de La Plata. 140 pp

Mugni H, Demetrio P, Marino D, Ronco A, Bonetto C (2010) Toxicity persistence following an experimental cypermethrin and chlorpyrifos application in pampasic surface

waters (Buenos Aires, Argentina). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 84:524–528
doi:org/10.1007/s00128-010-9986-z

Mugni H, Ronco A, Bonetto C (2011) Insecticide toxicity to *Hyalella curvispina* in runoff and stream water within a soybean farm (Buenos Aires, Argentina) Ecotoxicol. Environ. Saf. 74:350-354 doi:10.1016/j.ecoenv.2010.07.030

Mugni H, Demetrio P, Paracampo A, Pardi M, Bulus G, Bonetto C (2012) Toxicity Persistence in Runoff Water and Soil in Experimental Soybean Plots Following Chlorpyrifos Application. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 89:208–212 doi 10.1007/s00128-012-0643-6

Mugni H, Paracampo A, Bonetto C (2013) Nutrient Concentrations in a Pampasic First Order Stream with Different Land Uses in the Surrounding Plots (Buenos Aires, Argentina) Bull. Environ. Contam. Toxicol. 91(4):391-395 doi: 10.1007/s00128-013-1079-3

Muschal M (1998) Central and North West regions water quality program. Report on pesticides monitoring. CNR98.038. Department of Land and Water Conservation, Sydney, NSW, Australia

Negro C, Senkman LE, Marino F, Lorenzatti E, Collins P (2015) Pesticide effects on crabs: How environmental concentrations of endosulfan and chlorpyrifos affect embryos. Journal of Environmental Science and Health, Part B 50:261–265

Nguyen L, Downes M, Melhorn M, Stroud M (Eds) (1999) Riparian wetland processing of nitrogen, phosphorus and suspended sediment inputs from a hill country sheep-grazed catchment in NewZealand. Proceedings of the second Australian stream management conference. Hydrology 481-486

Ocón CS & Rodríguez A (2004) Presence and abundance of Ephemeroptera and other sensitive macroinvertebrates in relation with habitat conditions in pampean streams (Buenos Aires, Argentina). Hydrobiol 159:473-487

PAN (2011) Pesticide Action Network North America. (<http://www.pesticideinfo.org>)
Entrada: Junio 2016

Pankaj AS, Saurabh G, Priyanka K, Govind K, Anjana S (2015) Novel pathway of cypermethrin biodegradation in a *Bacillus* sp. strain SG2 isolated from cypermethrin-contaminated agricultura field. *Biotech.* doi 10.1007/s13205-016-0372-3

Paracampo A, Mugni H, Demetrio P, Pardi M, Bulus G, Asborno M, Bonetto C (2012) Toxicity persistence in runoff from experimental soybean plots following pesticide applications. *J. Environ. Sci. Health, Part B* 47:761–768

Pavé P & Marchese M (2005) Invertebrados bentónicos como indicadores de calidad del agua en ríos urbanos (Paraná-Entre Ríos, Argentina). *Ecología Austral* 15:183-197

Pedersen S, Palmqvista A, Thorbekb P, Hamerb M, Forbesc V (2013) Pairing behavior and reproduction in *Hyalella azteca* as sensitive endpoints for detecting long-term consequences of pesticide pulses. *Aquatic Toxicology* 144:59– 65

Peluso (2011) Evaluación de efectos biológicos y biodisponibilidad de contaminantes en sedimentos del Río de La Plata y afluentes. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Bs As., Argentina. 170 pp

Pengue W (2000) Cultivos transgénicos ¿Hacia dónde vamos? Lugar Editorial S. A., Buenos Aires, 190 pp

Peruzzo P, Porta A, Ronco A (2008) Levels of Glyphosate in Surface Waters, Sediments and Soils Associated with Direct Sowing Soybean Cultivation in North Pampasic Region of Argentina. *Environmental Pollution* 156: 61-66

Peterson SM & Batley GE (1993) The fate of endosulfan in aquatic ecosystems. *Environmental Pollution* doi: 10.1016/0269-7491(93)90111-Z.

Rasmussena JJ, Baattrup-Pedersena A, Wiberg-Larsena P, McKnightb US, Kronvanga B (2011) Buffer strip width and agricultural pesticide contamination in Danish lowland streams: Implications for stream and riparian management. *Ecological Engineering* 37:1990– 1997

Rodrigues Capítulo A; M Tangorra, Ocón C (2001) Use of benthic macroinvertebrates to assess the biological status of Pampean streams in Argentina. *Aquat. Ecol.* 35(2):109-119

Rodrigues Capítulo A, Paggi AC, Ocón C (2002) Zoobenthic communities in relation to slope, substrate heterogeneity and urban disturbances in Pampean hill streams (Argentina). Verh. Internat. Verein. Limnol. 28:1267-1273

Rodrigues Capítulo A, Ocón C, Tangorra (2003) Una visión bentónica de arroyos y ríos Pampeanos. Biología acuática N° 21 ISSN 1668-4869

Schäfer RB, Caquet T, Siimes K, Mueller R, Lagadic L, Liess M (2007) Effects of pesticides on community structure and ecosystem functions in agricultural streams of three biogeographical regions in Europe. Sci. Total Environ. 382:272–285

Schäfer RB, Von der Ohe CP, Rasmussen J, Kefford BJ, Beketov MA, Schulz R, Liess M (2012) Thresholds for the Effects of Pesticides on Invertebrate Communities and Leaf Breakdown in Stream Ecosystems. Environ. Sci. Technol. 46:5134–5142

Scheibler EE (2008) Biodiversidad de insectos acuáticos en zonas áridas del centro-oeste andino (Mendoza, Argentina). Cuadernos de Biodiversidad no 25

Schepers JS & Francis DD (1982) Chemical Water Quality of Runoff From Grazing Land in Nebraska: I. Influence of Grazing Livestock. J. Environ. Qual. 11:351-354

Schulz R & Peall S (2001) Effectiveness of a constructed wetland for retention of nonpoint-source pesticide pollution in the Lourens River catchment, South Africa. Environ. Sci. Technol. 35:422-426

Schulz R (2001) Rainfall-induced sediment and pesticide input from orchards into the Lourens River, Western Cape, South Africa: importance of a single event. Water Res. 35:1869–1876

Segnini S (2003) El Uso De Los Macroinvertebrados bentónicos como indicadores de la condición ecológica de los cuerpos de agua corriente. Ecotropicos 16:45-63

Sokal RR, Rohlf FJ (1979) Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. H. Blume Ediciones, Madrid

Somma LA, Giusto A, Ferrari L (2011) Manual de producción de *Hyaella curvispina* En Laboratorio. Comisión de investigaciones científicas, Buenos Aires 25pp

Song MY, Leprieur F, Thomas A, Lek-Ang S, Chon T-S, Lek S (2009) Impact of agricultural land use on aquatic insect assemblages in the Garonne river catchment (SW France). *Aquat Ecol.* 43:999–1009

Stehle S, Schulz R (2015) Agricultural insecticides threaten surface waters at the global scale. Edited by Jules M. Blais, University of Ottawa, Ottawa, Canada, March 2015 (www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1500232112)

Sucahyo D, van Straalen NM, Krave A, van Gestel CAM (2008) Acute Toxicity of Pesticides to the Tropical Freshwater Shrimp *Caridina Laevis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69:421-427

Tate TM, Spurlock JO, Christian (1997) Effect of glyphosate on the development of *Pseudosuccinea columella* snails. *Arch. Environ. Contam. Toxicol* 33:286-289

Tilman D, Fargione J, Wolff B, D'Antonio C, Doson A, Howarth R, Schindler D, Schlesinger WH, Simberloff D, Swackhamer D (2001) Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science* 292:281-292

Tsui MTK & Chu LM (2004) Comparative Toxicity of Glyphosate-based Herbicides: Aqueous and Sediment Porewater Exposures. *Archive of Environmental Contamination and Toxicology* 46:316-323

USEPA (1996) METHOD 8081 - A. Organochlorine pesticides by gas chromatography (<http://www.caslab.com/EPA-Methods/PDF/8081a.pdf>)

USEPA (1999) Probit Analysis Program, Software 1.5. EUA (<http://www.epa.gov>)

USEPA (2000) Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, second ed. USEPA, Washington, DC (EPA 600/R-99/064)

USEPA (2002) Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms, 5th edn. EPA-821-R-02-012, Washington, DC

USEPA (2007) Report on the Environment: Science Report.
<https://cfpub.epa.gov/ncea/risk/recordisplay.cfm?deid=140917>

USEPA (2007a) Addendum to the Ecological Risk Assessment for Endosulfan, Memorandum to special Review and Preregistration branch. Oct 31. EPA-HQ-QPP-202-0262-0063
<http://chm.pops.int/Portals/0/Repository/Endosulfan2008/UNEP-POPS-POPRC-END-08-USA-3.English.PDF>

USEPA (2007b) Note to Reader. Endosulfan readers guide. Nov 16. EPA-HQ-OPP-2002-0262-0057

USEPA (2015a) Species sensitivity distribution (SSD) generator software. (http://www.epa.gov/caddis/da_software_ssdmacro.html) Entrada: 2015 - 2016

USEPA (2015b) ECOTOX AQUIRE data base (<http://cfpub.epa.gov/ecotox/>) Entrada: 2015 – 2016

Velásquez SM & Miserendino M L (2003) Habitat type and macroinvertebrate assemblage in low order Patagonian streams. Arch. Hydrobiol. 158(4): 461-483

Walker PD, Wijnhoven S, van der Veldea G (2013) Macrophyte presence and growth form influence macroinvertebrate community structure. Aquatic Botany 104:80-87

Wan MT, Szeto S, Price P (1995) Distribution of endosulfan. Residues in the drainage waterways of the Lower Fraser Valley of British Columbia. J Environ Sci Health B 30:401–433

Weber J, Halsall CJ, Muir D, Teixeira C, Small J, Solomon K, Hermanson M, Hung H, Bidleman T (2010) Endosulfan, a global pesticide: A review of its fate in the environment and occurrence in the Arctic. Sci. Total Environ. 408:966–2984

Wheelock CE, Miller JL, Miller MJ, Phillips BM, Gee SJ, Tjeerdema RS, Hammock BD (2005) Influence of container adsorption upon observed pyrethroid toxicity to *Ceriodaphnia dubia* and *Hyalella azteca*. Aquat. Toxicol. 74:47–52

Xuereb B, Chaumot A, Mons R, Garric J, Geffard O (2009) Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda) intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys. *Aquat. Toxicol.* 93:225–233

You J, Schuler LJ, Lydy MJ (2005) Acute toxicity of sediment-sorbed Endrin, Methoxychlor, and Endosulfan to *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 73:457–464

You J, Weston DP, Lydy MJ (2004) A sonication extraction method for the analysis of pyrethroid, organophosphate, and organochlorine pesticides from sediment by gas chromatography with electron-capture detection. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 47(2):141–147

Zaliznyak L & Nugegoda D (2006) Effect of sublethal concentrations of chlorpyrifos on three successive generations of *Daphnia carinata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64(2):207-214