



ESTUDIO ECOTOXICOLOGICO EN LA CUENCA HÍDRICA DEL ARROYO LAS CONCHITAS (BUENOS AIRES) CON EMBRIONES DE VERTEBRADOS

*Tesis presentada para obtener el título de Magister en Ingeniería Ambiental de la
Universidad Tecnológica Nacional Facultad Regional Avellaneda*

Tesista:

Esp. Lic. Montaldo A. Damián

Director de tesis: Dr. Herkovits Jorge

Lugar de trabajo: Instituto de Ciencias Ambientales y Salud

Fundación PROSAMA

Avellaneda, 07 de Junio de 2020

ESTUDIO ECOTOXICOLÓGICO EN LA CUENCA HÍDRICA DEL ARROYO LAS CONCHITAS (BUENOS AIRES) CON EMBRIONES DE VERTEBRADOS

RESUMEN

En el presente estudio, se evaluó la toxicidad aguda y crónica del agua del arroyo Las Conchitas en cuatro estaciones de monitoreo, la primera en el Parque Ecológico Cultural Guillermo Hudson, con mínimo impacto antrópico y las restantes con un impacto más elevado. Los bioensayos de ecotoxicidad se realizaron con embriones de un anfibio nativo, *Rhinella arenarum* según el método ANFITOX y de *Danio rerio*, un pez originario del sudeste asiático según el método CEBRATOX, por analogía (y con resultados similares). Con excepción de la primera estación, en la cual no se detectó toxicidad aguda ni crónica, en todas las demás estaciones de monitoreo que incluyeron zonas industriales y residenciales, la toxicidad fue superior a la máxima admisible para efluentes industriales (USEPA, 1991). Para toxicidad aguda y crónica los valores fueron hasta 2,5 y 5 veces superiores al máximo admisible. Con este objetivo, y analizando la evolución de la problemática desde 1997, se buscó determinar el nivel de toxicidad de la cuenca a fin de realizar una comparación objetiva con los estudios de toxicidad realizados en cuenca en el año 2002 (Herkovits, y otros, 2003) y así intentar efectuar un diagnóstico del estado ambiental en el que se encuentra. Siendo la ecotoxicología, en dicho contexto, una herramienta de diagnóstico y monitoreo holístico del impacto antrópico para reunir bajo un criterio común no solo la calidad de aguas y sedimentos sino para todo aquello que se vierta sobre un cuerpo superficial tales como efluentes industriales, lixiviados, etc. Asimismo, el método ANFITOX se presenta como una metodología estandarizada, simple, rápida, económica y acorde con estándares internacionales. Informes basados solo en mortalidad, permiten caracterizar la magnitud del deterioro en la calidad del agua comprensible por legos y expertos. Como efectos subletales, se registraron retraso en el desarrollo, incurvaciones en el eje, ausencia de aleta ventral de la cola, etc. situaciones cuyo registro permite perfeccionar el método para futuros estudios.

Por último, y en función de las diversas características topográficas de la cuenca, a través de las curvas de nivel obtenidas con el software ArcGis 10.5, por primera vez, ésta ha sido subdividida en tres áreas: Cuenca Alta, Cuenca Media y Cuenca Baja. También se realizó un análisis fisicoquímico, con el fin de establecer relación entre las estaciones de monitoreo y las actividades antrópicas, comparando estos resultados con los valores guía de referencia establecidos por el marco legal en la Argentina.

Palabras Clave: Toxicidad aguda, toxicidad crónica, desarrollo embrionario, anfibio, pez, cuenca hídrica, arroyo Las Conchitas, ecotoxicología, ArcGis, ANFITOX, CEBRATOX.

ECOTOXICOLOGICAL STUDY AT THE RIVER BASIN LAS CONCHITAS (BUENOS AIRES) WITH VERTEBRATE EMBRYOS

ABSTRACT

In the present study, the acute and chronic toxicity of the water of the Las Conchitas stream was evaluated in four monitoring stations, the first in the Guillermo Hudson Cultural Ecological Park, with minimal anthropic impact and the others with a higher impact. The ecotoxicity bioassays were carried out with embryos of a native amphibian, *rhinella arenarum* according to the AMPHITOX method and *danio rerio*, a fish originating from Southeast Asia according to the ZEBRATOX method, by analogy (and with similar results). With the exception of the first station, in which neither acute nor chronic toxicity was detected, in all the other monitoring stations that included industrial and residential areas, the toxicity was higher than the maximum admissible for industrial effluents (USEPA, 1991). For acute and chronic toxicity the values were up to 2.5 and 5 times higher than the maximum admissible. With this objective, and analyzing the evolution of the problem since 1997, we sought to determine the level of toxicity in the basin in order to make an objective comparison with the toxicity studies carried out in the basin in 2002 (Herkovits, y otros, 2003) and thus try to make a diagnosis of the environmental state in which it is. Being the ecotoxicology, in this context, a tool of holistic diagnosis and monitoring of the anthropic impact to gather under a common criterion not only the quality of waters and sediments but for everything that is poured on a superficial body such as industrial effluents, leachates, etc. Likewise, the AMPHITOX method is presented as a standardized, simple, fast, economical methodology and in accordance with international standards. Reports based only on mortality allow us to characterize the magnitude of the deterioration in water quality understandable by laymen and experts. As sublethal effects, developmental delay, incurvations in the axis, absence of ventral tail fin, etc. were recorded situations whose registration allows to perfect the method for future studies.

Finally, and based on the different topographic characteristics of the basin, through the contour lines obtained with the ArcGis 10.5 software, for the first time, it has been subdivided into three areas: Upper Basin, Middle Basin and Lower Basin. A physicochemical analysis was also carried out, in order to establish a relationship between monitoring stations and anthropic activities, comparing these results with the reference guide values established by the legal framework in Argentina.

Keywords: Acute toxicity, chronic toxicity, embryonic development, amphibian, fish, watershed, Las Conchitas stream, ecotoxicology, ArcGis, AMPHITOX, ZEBRATOX.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Herkovits Jorge, mi director de tesis, por su confianza desde el primer momento. Por todo lo que me enseñó y me ayudó, por su paciencia y por su tiempo ¡Muchas gracias!

A la Fundación PROSAMA y el Instituto de Ciencias Ambientales y Salud (ICAS) por abrirme sus puertas y poner a mi disposición todo el personal que allí trabaja con mucho énfasis y profesionalismo. En especial a José Luis, quién compartió conmigo toda su experiencia.

A la Mg. Ing. Speltini Cristina y al Mg. Ing. Machalec Jorge, quienes desde el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Tecnológica Nacional Regional Avellaneda me brindaron todo su apoyo y confianza.

Al Lic. Candía Alberto, pilar importantísimo para hacer posible este trabajo acompañándome y ayudándome con todo el proceso de muestreo del arroyo de punta a punta.

A la Dra. Torrero Mariana, compañera de trabajo quien supo compartir conmigo toda su experiencia en el proceso de trabajo con el software ArcGis.

Al Mg. Ing. Giménez Lucas, quién en su paso por la ACUMAR solo me dejó palabras de aliento y motivación para iniciar este largo camino, ayudándome con lo que estuvo a su alcance.

A mis tres amores y motores de mi vida: Florencia, la mejor compañera para transitar juntos este hermoso camino que es la vida, y a luz de mis ojos; Renata y Simón. Gracias por el aguante incondicional y la fuerza que me dan todos los días.

A mi mamá, mis hermanas, mis sobrinos y mi cuñado, por apoyarme y darme fuerza en los malos momentos y compartir conmigo toda esa alegría infinita cuando las cosas salen bien.

A la familia Jakubowicz y Radetich, por abrirme sus puertas y permitirme ser parte de esa hermosa familia.

A mis compañeros de trabajo Daniel, Gabriel y Carlos por aconsejarme, escucharme, motivarme y brindarme su apoyo.

A TODOS, SIMPLEMENTE ¡GRACIAS!

DEDICATORIA

A ALBERTO OMAR MONTALDO,
PENSANDO EN VOS SIEMPRE...SIEMPRE EXTRAÑÁNDOSE.

INDICE

TABLA DE FIGURAS.....	- 5 -
TABLA DE ILUSTRACIONES	- 12 -
TABLA DE CUADROS.....	- 14 -
GLOSARIO Y ABREVIATURAS	- 16 -
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL.....	- 18 -
1.1 Cuencas hidrográficas en la República Argentina	- 19 -
1.2 Arroyo Las Conchitas: características de la cuenca	- 24 -
1.2.1 Topografía	- 24 -
1.2.1.1 Características topográficas del área en estudio	- 26 -
1.2.2 Hidrología superficial	- 27 -
1.3 Caracterización de la cuenca: cuenca alta, media y baja	- 28 -
1.4 Evolución de la problemática en la cuenca desde 1997	- 33 -
1.4.1 Judicialización de la cuenca	- 34 -
1.4.2 Contaminación ambiental con plomo en el Barrio La Rotonda- Florencio Varela	- 34 -
1.4.2.1 Situación	- 34 -
1.4.2.2 Resultados y conclusión de los estudios	- 35 -
1.4.3 Denuncia penal por contaminación en Florencio Varela	- 38 -
1.5 Objetivos generales	- 41 -
CAPÍTULO 2: ECOTOXICOLOGÍA; UNA HERRAMIENTA DE GESTIÓN SUSTENTABLE PARA CUENCAS HÍDRICAS	- 42 -
2.1 Aportes de la ecotoxicología a las regulaciones ambientales	- 43 -
2.1.1 Antecedentes de Ecocidio (Tragedia en la Bahía de Minamata y la declinación de poblaciones de aves silvestres)	- 43 -

2.1.2 Las profecías de Purchase	- 45 -
2.2 Enfoques y criterios aplicados para el saneamiento de cuencas hídricas	- 46 -
<hr/>	
2.3 La ecotoxicología como herramienta de diagnóstico y monitoreo para cuencas hídricas.....	- 47 -
<hr/>	
CAPÍTULO 3: ORGANISMOS MODELOS COMO BIOINDICADORES.....	- 49 -
<hr/>	
3.1 ¿Qué es un organismo modelo?	- 50 -
<hr/>	
3.2 Modelo biológico vertebrado I; Anfibio (<i>rhinella arenarum</i>).....	- 51 -
3.2.1 Situación de los anfibios	- 51 -
3.2.2 El modelo biológico: <i>rhinella arenarum</i> (Sapo americano)	- 52 -
<hr/>	
3.3 Modelo biológico vertebrado II; Pez (<i>danio rerio</i>)	- 58 -
3.3.1 Situación de los peces.....	- 58 -
3.3.2 El modelo biológico: <i>danio rerio</i> (Pez cebra).....	- 61 -
<hr/>	
CAPÍTULO 4: ESTACIONES DE MONITOREO, ZONIFICACIÓN, EXTRACCIÓN DE MUESTRA Y PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS	- 65 -
<hr/>	
4.1 Estaciones de monitoreo.....	- 66 -
<hr/>	
4.2 Zonificación.....	- 71 -
<hr/>	
4.3 Extracción de muestras.....	- 73 -
<hr/>	
4.4 Parámetros fisicoquímico de las muestras extraídas en las estaciones de monitoreo.....	- 76 -
4.4.1 Parámetros <i>in situ</i>	- 76 -
4.4.2 Parámetros <i>ex situ</i>	- 76 -
<hr/>	
CAPÍTULO 5: BIOENSAYOS DE TOXICIDAD, DISEÑO EXPERIMENTAL I: EMBRIONES DE ANFIBIOS	- 80 -
<hr/>	
5.1 Materiales y métodos generales.....	- 81 -
5.1.1 Obtención del material biológico vertebrado I – <i>rhinella arenarum</i>	- 81 -
5.1.2 Criterio de aceptación del material biológico.....	- 83 -
5.1.3 Bioensayos de toxicidad	- 83 -

5.1.3.1 Test agudo (ANFIAGU).....	- 84 -
<hr/>	
5.1.3.2 Test crónico corto (ANFICOR)	- 85 -
<hr/>	
5.1.3.3 Test crónico (ANFICRO)	- 85 -
<hr/>	
5.1.4 Condiciones de los bioensayos	- 85 -
<hr/>	
5.1.5 Registro y análisis de los datos	- 86 -
<hr/>	
5.2 Toxicidad del arroyo sobre el desarrollo embrionario del <i>rhinella arenarum</i>	- 87 -
<hr/>	
5.2.1 Preparación de las diluciones de exposición	- 87 -
<hr/>	
5.2.2 Bioensayos de toxicidad	- 88 -
<hr/>	
5.3 Registro de sobrevida de embriones <i>rhinella arenarum</i> a partir del E25 cada 24 (h)-	89 -
<hr/>	
5.4 Curvas de sobrevida de embriones de <i>rhinella arenarum</i> a partir del E25.....	- 90 -
<hr/>	
5.4.1 Estación de Monitoreo 1	- 90 -
<hr/>	
5.4.2 Estación de Monitoreo 2	- 93 -
<hr/>	
5.4.3 Estación de Monitoreo 3	- 96 -
<hr/>	
5.4.4 Estación de Monitoreo 4	- 99 -
<hr/>	
5.5 Comparación de las curvas de sobrevida de las estaciones de monitoreo para las mismas concentraciones.....	- 102 -
<hr/>	
5.6 Resultados ANFITOX.....	- 104 -
<hr/>	
CAPÍTULO 6: BIOENSAYOS DE TOXICIDAD, DISEÑO EXPERIMENTAL II: EMBRIONES DE PECES	- 106 -
<hr/>	
6-1 Materiales y métodos generales	- 107 -
<hr/>	
6-1.1 Obtención del material biológico vertebrado II – <i>danio rerio</i>	- 107 -
<hr/>	
6-1.2 Criterio de aceptación del material biológico	- 110 -
<hr/>	
6-1.3 Bioensayos de toxicidad.....	- 110 -
<hr/>	
6.1.3.1 Test agudo (ZEBRAGU).....	- 111 -
<hr/>	
6.1.3.2 Test crónico corto (ZEBRACOR).....	- 111 -

6.1.3.3 Test crónico (ZEBRACRO)	- 112 -
6-1.4 Condiciones de los bioensayos	- 112 -
<hr/>	
6-1.5 Registro y análisis de los datos	- 113 -
6.2 Toxicidad del arroyo sobre el desarrollo embrionario del <i>danio rerio</i>	- 114 -
6.2.1 Preparación de las diluciones de exposición	- 114 -
<hr/>	
6.2.2 Bioensayos de toxicidad	- 114 -
6.3 Registro de sobrevivencia de embriones <i>danio rerio</i> a partir del 18 - SOMITE cada 24 (h)-	115 -
<hr/>	
6.4 Curvas de sobrevivencia de embriones de <i>danio rerio</i> a partir del E18-SOMITE.....	- 117 -
6.4.1 Estación de Monitoreo 1	- 117 -
<hr/>	
6.4.2 Estación de Monitoreo 2	- 120 -
<hr/>	
6.4.3 Estación de Monitoreo 3	- 123 -
<hr/>	
6.4.4 Estación de Monitoreo 4	- 126 -
6.5 Comparación de las curvas de sobrevivencia de las estaciones de monitoreo para las mismas concentraciones.....	- 129 -
<hr/>	
6.6 Resultados ZEBRATOX	- 131 -
<hr/>	
CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES GENERALES	- 133 -
<hr/>	
7.1 Conclusión sobre los parámetros fisicoquímicos obtenidos del arroyo Las Conchitas-	134 -
<hr/>	
7.2 Conclusión sobre los estudios ecotoxicológicos obtenidos del arroyo Las Conchitas-	135 -
<hr/>	
ANEXOS.....	- 137 -
<hr/>	
Anexo I	- 138 -
Los primeros estadios del desarrollo en <i>bufo arenarum</i> (Del Conte & Sirlin, 1951)	- 138 -
Anexo II.....	- 143 -
Estadios del desarrollo embrionario de <i>danio rerio</i> (Kimmel, Ballard, Kimmel, Ullmann, & Schilling, 1995).....	- 143 -
BIBLIOGRAFÍA.....	- 147 -

TABLA DE FIGURAS

Figura 1- Cuenca del plata: Cuenca exorreica de vertiente atlántica más importante de Argentina; estuario del río de la plata. Fuente: Instituto Nacional del Agua (INA).....	- 22 -
Figura 2- Cuencas hidrográficas en la república Argentina Fuente: Cartografía atlas digital de los recursos hídricos superficiales de la república argentina. subsecretaría de recursos hídricos. instituto nacional del agua 2002.....	- 23 -
Figura 3- Curvas de nivel cuenca hídrica arroyo las conchitas. Fuente: Elaboración propia en ArcGis.....	- 25 -
Figura 4- Cuenca hidrográfica del arroyo las conchitas delimitada por curvas de nivel. fuente: elaboración propia	- 26 -
Figura 5- Cuencas de la región metropolitana de buenos aires; vertiente del río de la plata. Fuente: Observatorio metropolitano	- 28 -
Figura 6- Historia del agua y mitos del ciclo hidrológico Fuente: Hidrogeo corporation	- 29 -
Figura 7- Impacto acumulados de las actividades humanas en una cuenca hidrográfica Fuente: ACUMAR (Autoridad de cuenca Matanza-Riachuelo)	- 30 -
Figura 8- Perfil divisorio cuenca alta; cuenca media Fuente: elaboración propia.....	- 31 -
Figura 9- Perfil divisorio cuenca media; cuenca baja Fuente: elaboración propia.....	- 32 -
Figura 10- División de la cuenca hidrográfica del arroyo Las Conchitas en relación a sus curvas de nivel. Fuente: Elaboración propia	- 33 -
Figura 11- Contaminación ambiental barrio La Rotonda Fuente: Elaboración propia	- 35 -
Figura 12- Empresas radicadas en los márgenes del barrio La Rotonda Fuente: Elaboración propia.....	- 36 -
Figura 13- Distribución de los contaminantes.....	- 37 -
Figura 14- Distribución de agua potable según CAA.....	- 37 -
Figura 15- Categorización del estado de conservación de las especies de anfibios en el mundo Fuente: IUCN 2013	- 51 -
Figura 16- Ejemplar adulto de <i>rhinella arenarum</i> (Sapo común americano)	- 52 -

Figura 17- Reproducción <i>rhinella arenarum</i> : (A) Llamada de apareamiento del ejemplar macho; (B) Amplexo; (C) Ristra de huevos fecundados; (D) Larvas de vida libre (renacuajos). FUENTE: Elaboración propia	- 54 -
Figura 18- Desarrollo <i>rhinella arenarum</i> (A) huevos; (B) Embriones dentro de la ristra gelatinosa; (C) Embriones recién eclosionados que permanecen fijados a la ristra; (D) Larva pre-metamórfica; (E) Larva pro-metamórfica, miembros posteriores en desarrollo; (F) Larva metamórfica, miembros anteriores en desarrollo; (G) Larva metamórfica, cola reabsorbiéndose; (H) Juveniles recién metamorfoseados. FUENTE: (Svartz, 2014)	- 57 -
Figura 19- Distribución de <i>rhinella arenarum</i> en Argentina Fuente: Sistema de información de biodiversidad (SIB) de la Administración de Parques Nacionales	- 58 -
Figura 20- Ejemplar hembra y macho de danio rerio en laboratorio.	- 61 -
Figura 21- Hábitat y distribución de pez <i>danio rerio</i> . fuente: (Vive la Naturaleza, 2020)	- 62 -
Figura 22- Proceso de desove (A) Separación de hembra y macho con regulación de temperatura; (B) Preparación del estanque para incorporación de algunos ejemplares; (C) Proceso de apareamiento; (D) Desove Fuente- fundación PROSAMA.	- 63 -
Figura 23- Estadios del desarrollo embrionario del pez <i>danio rerio</i>	- 64 -
Figura 24- Límite de la cuenca hídrica del arroyo Las conchitas con sus estaciones de monitoreo. Fuente: Elaboración propia	- 67 -
Figura 25- Estaciones de monitoreo y división de cuenca en: cuenca alta, media y baja. Fuente: elaboración propia	- 68 -
Figura 26- Estación de monitoreo N°1: Intersección con Av. Guillermo Hudson, altura Parque ecológico cultural Guillermo Hudson Fuente: elaboración propia	- 69 -
Figura 27- Estación de monitoreo N°2; Intersección Ruta Provincial N°36 “Av. Calchaquí) Fuente: elaboración propia	- 69 -
Figura 28- Estación de monitoreo N°3; Interacción con Ruta Provincial N°1 “Camino General Belgrano” Fuente: elaboración propia	- 70 -
Figura 29- Estación de monitoreo N°4; Interacción con Autopista Buenos Aires La Plata, altura peaje Hudson Fuente: elaboración propia.....	- 70 -
Figura 30 - Countries y barrios privados con incidencia directa o indirecta predominantemente en cuenca baja. Fuente: Elaboración propia	- 71 -

Figura 31- Establecimientos industriales de 2° y 3° categoría ambiental en cuenca media. Fuente: Elaboración propia - 72 -

Figura 32- Cuenca alta: Parque Ecológico Guillermo Hudson y Complejo penitenciario de Florencio Varela. Fuente: elaboración propia..... - 73 -

Figura 33- Imágenes obtenidas con cámara digital que muestran la secuencia del protocolo ANFITOX para la obtención del material biológico: (A) Hembra *rhinella arenarum* diseccionada; (B) ristra de huevos recién fecundados inmersos en la gelatina; (C) ristra de huevos en SA; (D) Selección de embriones; (E) Huevos fecundados luego de la desgelatinización; (F) embriones (E25)..... - 83 -

Figura 34- Curvas de sobrevivencia de embriones de *rhinella arenarum* expuestos de forma continua a distintas concentraciones de muestras del arroyo las conchitas durante 96 (h) para la EM1- ANFIAGU..... - 90 -

Figura 35- Curvas de sobrevivencia de embriones de *rhinella arenarum* expuestos de forma continua a distintas concentraciones de muestras del arroyo las conchitas durante 168 (h) para la EM1- ANFICOR..... - 91 -

Figura 36- Curvas de sobrevivencia de embriones de *rhinella arenarum* expuestos de forma continua a distintas concentraciones de muestras del arroyo las conchitas durante 336 (h) para la EM1- ANFICRO..... - 91 -

Figura 37- Imágenes de microscopía estereoscópica de embriones de *rhinella arenarum* expuestos en forma continua a distintas concentraciones de muestras de la estación de monitoreo n°1 del arroyo Las Conchitas a partir del estadio de opérculo completo (E25): (A) Organismo control 96 (h); (B) 100% de muestra a 96 (h); (C) 100% de muestra a 168 (H), hidropesía, cola ondulada; (D) 100% de muestra a 336 (h), hidropesía, cola ondulada. - 92 -

Figura 38- Curvas de sobrevivencia de embriones de *rhinella arenarum* expuestos de forma continua a distintas concentraciones de muestras del arroyo las conchitas durante 96 (h) para la EM2- ANFIAGU..... - 93 -

Figura 39- Curvas de sobrevivencia de embriones de *rhinella arenarum* expuestos de forma continua a distintas concentraciones de muestras del arroyo las conchitas durante 168 (h) para la EM2- ANFICOR..... - 93 -

Figura 40- Curvas de sobrevivencia de embriones de *rhinella arenarum* expuestos de forma continua a distintas concentraciones de muestras del arroyo las conchitas durante 336 (h) para la EM2- ANFICRO..... - 94 -

Figura 41- Imágenes de microscopía estereoscópica de embriones de *rhinella arenarum* expuestos en forma continua a distintas concentraciones de muestras de la estación de monitoreo n°2 del arroyo Las Conchitas a partir del estadio de opérculo completo (E25): (A) Organismo control 96 (h); (B) 100% de muestra a 96 (h), embrión muerto; (C) 60% de muestra a 168 (H), hidropesía, incurvación dorsal de la cola; (D) 40% de muestra a 240 (h), hidropesía, cola ondulada, microcefalia. - 95 -

Figura 42- Curvas de sobrevivencia de embriones de *rhinella arenarum* expuestos de forma continua a distintas concentraciones de muestras del arroyo las conchitas durante 96 (h) para la EM3-ANFIAGU..... - 96 -

Figura 43- Curvas de sobrevivencia de embriones de *rhinella arenarum* expuestos de forma continua a distintas concentraciones de muestras del arroyo las conchitas durante 168 (h) para la EM3-ANFICOR..... - 96 -

Figura 44- Curvas de sobrevivencia de embriones de *rhinella arenarum* expuestos de forma continua a distintas concentraciones de muestras del arroyo las conchitas durante 336 (h) para la EM3-ANFICRO..... - 97 -

Figura 45- Imágenes de microscopía estereoscópica de embriones de *rhinella arenarum* expuestos en forma continua a distintas concentraciones de muestras de la estación de monitoreo n°3 del arroyo Las Conchitas a partir del estadio de opérculo completo (E25): (A) Embrión expuesto a concentración del 100% en 24 h, inhibición en el subdesarrollo general, sin vida; (B) embrión expuesto a concentración del 80% en 24 h, sin vida; (C) Embrión expuesto al 60% en 96 h, sin vida; (D) Embrión expuesto al 40% en 120 h, sin vida. - 98 -

Figura 46- Curvas de sobrevivencia de embriones de *rhinella arenarum* expuestos de forma continua a distintas concentraciones de muestras del arroyo las conchitas durante 96 (h) para la EM4-ANFIAGU..... - 99 -

Figura 47- Curvas de sobrevivencia de embriones de *rhinella arenarum* expuestos de forma continua a distintas concentraciones de muestras del arroyo las conchitas durante 168 (h) para la EM4-ANFICOR..... - 99 -

Figura 48- Curvas de sobrevivencia de embriones de *rhinella arenarum* expuestos de forma continua a distintas concentraciones de muestras del arroyo las conchitas durante 336 (h) para la EM4-ANFICRO..... - 100 -

Figura 49- Imágenes de microscopía estereoscópica de embriones de *rhinella arenarum* expuestos en forma continua a distintas concentraciones de muestras de la estación de

monitoreo n°4 del arroyo Las Conchitas a partir del estadio de opérculo completo (E25): (A) Embrión expuesto a concentración del 100% en 24 h, sin vida; (B) embrión expuesto a concentración del 80% en 24 h, hidropesía, incurvación dorsal de la cola; (C) Embrión expuesto al 60% en 72 h, marcada hidropesía; (D) Embrión expuesto al 40% en 144 h, hidropesía, subdesarrollo general, microcefalia..... - 101 -

Figura 50- Embriones de *rhinella arenarum* (E25) expuestos al 100% con muestra ambiental ... - 102 -

Figura 51- Embriones de *rhinella arenarum* (E25) expuestos al 80% con muestra ambiental - 102 -

Figura 52- Embriones de *rhinella arenarum* (E25) expuestos al 60% con muestra ambiental - 103 -

Figura 53- Embriones de *rhinella arenarum* (E25) expuestos al 40% con muestra ambiental - 103 -

Figura 54- Curvas de sobrevivencia de embriones de danio rerio expuestos de forma continua a distintas concentraciones de muestras del arroyo las conchitas durante 96 (h) para la EM1-ZEBRAGU - 117 -

Figura 55- Curvas de sobrevivencia de embriones de danio rerio expuestos de forma continua a distintas concentraciones de muestras del arroyo las conchitas durante 168 (h) para la EM1-ZEBRACOR..... - 117 -

Figura 56- Curvas de sobrevivencia de embriones de danio rerio expuestos de forma continua a distintas concentraciones de muestras del arroyo las conchitas durante 336 (h) para la EM1-ZEBRACRO - 118 -

Figura 57- Imágenes de microscopía estereoscópica de embriones *danio rerio* eclosionados (A) Exposición al 20% en 96 h; (B) Exposición al 40% en 96 h; (C) Exposición al 60% en 96 h. en las concentraciones mencionadas no se registran observaciones. (D) Exposición al 80% en 96 h, se observa malformación: cola dorsal doblada y pérdida de la pigmentación de orden genético. - 119 -

Figura 58- Curvas de sobrevivencia de embriones de *danio rerio* expuestos de forma continua a distintas concentraciones de muestras del arroyo las conchitas durante 96 (h) para la EM2-ZEBRAGU - 120 -

Figura 59- Curvas de sobrevivencia de embriones de *danio rerio* expuestos de forma continua a distintas concentraciones de muestras del arroyo las conchitas durante 168 (h) para la EM2-ZEBRACOR..... - 120 -

Figura 60- Curvas de sobrevivencia de embriones de *danio rerio* expuestos de forma continua a distintas concentraciones de muestras del arroyo las conchitas durante 336 (h) para la EM2-ZEBRACRO - 121 -

Figura 61- Imágenes de microscopía estereoscópica de embriones *danio rerio* eclosionados (A) Embrión sin vida sin eclosionar expuesto 96 h al 20%; (B) Organismo control 96 h; (C) Exposición al 60% 168 h, se observa ausencia de pigmentación de orden genético, hidropesía y ondulación vertebral (D) Exposición al 20% 336 h, incurvación dorsal lateral. - 122 -

Figura 62- Curvas de sobrevivencia de embriones de *danio rerio* expuestos de forma continua a distintas concentraciones de muestras del arroyo las conchitas durante 96 (h) para la EM3-ZEBRAGU - 123 -

Figura 63- Curvas de sobrevivencia de embriones de *danio rerio* expuestos de forma continua a distintas concentraciones de muestras del arroyo las conchitas durante 168 (h) para la EM3-ZEBRACOR..... - 123 -

Figura 64- Curvas de sobrevivencia de embriones de *danio rerio* expuestos de forma continua a distintas concentraciones de muestras del arroyo las conchitas durante 336 (h) para la EM3-ZEBRACRO - 124 -

Figura 65- Imágenes de microscopía estereoscópica de embriones *danio rerio* eclosionados (A) Embrión eclosionado expuesto al 40% en 48 h; (B) Embrión eclosionado expuesto al 60% en 48 h, se observa ausencia de pigmentación e incurvación dorsal, retraso en el desarrollo; (C) Embrión sin vida, expuesto al 80% en 48 h; (D) Embrión con retraso en el desarrollo de eclosión expuesto al 80% en 48h..... - 125 -

Figura 66- Curvas de sobrevivencia de embriones de *danio rerio* expuestos de forma continua a distintas concentraciones de muestras del arroyo las conchitas durante 96 (h) para la EM4-ZEBRAGU - 126 -

Figura 67- Curvas de sobrevivencia de embriones de *danio rerio* expuestos de forma continua a distintas concentraciones de muestras del arroyo las conchitas durante 168 (h) para la EM4-ZEBRACOR..... - 126 -

Figura 68- Curvas de sobrevivencia de embriones de *danio rerio* expuestos de forma continua a distintas concentraciones de muestras del arroyo las conchitas durante 336 (h) para la EM4-ZEBRACRO..... - 127 -

Figura 69- Imágenes de microscopía estereoscópica de embriones *danio rerio* eclosionados. (A) Embrión expuesto al 60% en el periodo de toxicidad agua de 96 h, se registra ausencia de pigmentación, ausencia de aleta ventral en cola; (B) embrión muerto pos eclosión, expuesto al 100% en el periodo de toxicidad aguda de 96 h; (C) Embriones de *Danio rerio* sin pigmentación, incurvación dorsal, retraso en el desarrollo de crecimiento, expuestos al 60% en el periodo de toxicidad agua; (D) Embriones con ausencia de pigmentación, cola doblada, incurvación dorsal y retraso en el desarrollo del crecimiento. Expuestos al 60% en el periodo de toxicidad agua de 96 h..... - 128 -

Figura 70- Embriones de *danio rerio* (E18-SOMITE) expuestos al 100% con muestra ambiental en 336 h..... - 129 -

Figura 71- Embriones de *danio rerio* (E18-SOMITE) expuestos al 80% con muestra ambiental en 336 h..... - 129 -

Figura 72- Embriones de *danio rerio* (E18-SOMITE) expuestos al 60% con muestra ambiental en 336 h..... - 130 -

Figura 73- Embriones de *danio rerio* (E18-SOMITE) expuestos al 40% con muestra ambiental en 336 h..... - 130 -

Figura 74- Embriones de *danio rerio* (E18-SOMITE) expuestos al 20% con muestra ambiental en 336 h..... - 131 -

TABLA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1- Muestra envasada y rotulada en campo (Estación de monitoreo M4). Elevación de muestra, registro y limpieza de equipo multiparamétrico.	- 75 -
Ilustración 2- Medición y registro <i>in situ</i> de parámetros con multiparamétrico (Estación monitoreo M2)	- 75 -
Ilustración 3-Elevación de muestra desde el puente de la Av. Calchaquí (Estación Monitoreo M3), trasvaso y registro.....	- 75 -
Ilustración 4- Equipo multiparamétrico hach hq40d utilizado en campo	- 75 -
Ilustración 5- - Recepción de muestras en laboratorio para análisis fisicoquímicos. De derecha a izquierda; M1, M2, M3, M4.....	- 77 -
Ilustración 6- Solución de Anfitox producida en laboratorio y contenida en envase de 40 L. -	82 -
Ilustración 7- Proceso de revisión, selección y retiro de material con presencia de anomalías y sin vida.....	- 87 -
Ilustración 8- Columna izquierda: Diluciones utilizadas; Fila superior: Muestras de las distintas estaciones de monitoreo del arroyo Las Conchitas y controles.	- 88 -
Ilustración 9- (A) Ejemplares machos de <i>danio rerio</i> aislados; (B) Ejemplares hembras de <i>Danio rerio</i> aislados. En ambos acuarios se separaron dentro del mismo algunos ejemplares para ser utilizados en la reproducción.....	- 107 -
Ilustración 10- Proceso de reproducción y desove de <i>danio rerio</i> . (a) Tanque n°1 con termostato, difusor y filtro; (B) Bandeja de vidrio utilizada como contención; (C) Recipiente plástico con orificios en parte inferior a fin de permitir el paso de los huevos; (D) Tanque en recirculación con ejemplares machos y hembras; (E) Proceso de iluminación artificial; (F) Desove de huevos	- 108 -
Ilustración 11- Solución de Zebratox producida en laboratorio y contenida en envase de 40 L... -	109 -
Ilustración 12- (A) Separación del material sobrenadante finalizado el desove; (B) Separación de huevos blancos (coagulados=muestrados) de los huevos vivos; (C) Huevos previo reposo en estufa; (D) Reposo en estufa a 28°C para posterior utilización en bioensayos	- 110 -
Ilustración 13- Proceso de revisión y selección de embriones <i>danio rerio</i> . (A) Selección de embriones y trasvaso a placas de Petri; (B) Revisión de embriones de <i>Danio rerio</i> en microscopio;	

(C) Preparación de las placas de Petri; (D) Embriones de *danio rerio* en muestra diluida con solución de Zebratox..... - 113 -

Ilustración 14- Columna izquierda: Diluciones utilizadas; Fila superior: Muestras de las distintas estaciones de monitoreo del arroyo Las Conchitas y controles - 115 -

TABLA DE CUADROS

Cuadro 1- Parámetros fisicoquímicos medidos en campo (<i>in situ</i>). Instrumental empleado: Multiparamétrico marca HACH, modelo HQ40D; Sonda de pH modelo PHC101 y Sonda de oxígeno disuelto LBOD101.	- 76 -
Cuadro 2- Muestra analizada, su identificación, tipo de muestra y envase.....	- 77 -
Cuadro 3- Características organolépticas determinadas sobre la muestra.....	- 77 -
Cuadro 4- Parámetros fisicoquímicos determinados <i>ex situ</i> sobre la muestra en el laboratorio. Instrumental empleado: Multiparamétrico marca HACH, modelo HQ40D; Sonda de pH modelo PHC101 y Sonda de oxígeno disuelto LBOD101. Espectrofotómetro marca HACH, modelo DR6000.....	- 78 -
Cuadro 5- Parámetros biológicos y químicos determinados <i>ex situ</i> sobre las muestras en el laboratorio.....	- 78 -
Cuadro 6- Parámetros químicos determinados <i>ex situ</i> sobre las muestras en el laboratorio. Instrumental empleado: Espectrofotómetro marca HACH, modelo DR6000.....	- 78 -
Cuadro 7- Registro de sobrevivencia de embriones de <i>rhinella arenarum</i> a partir del E25 cada 24 hs para la estación de monitoreo 1 durante 336 (h).....	- 89 -
Cuadro 8- Registro de sobrevivencia de embriones de <i>rhinella arenarum</i> a partir del E25 cada 24 hs para la estación de monitoreo 2 durante 336 (h).....	- 89 -
Cuadro 9- Registro de sobrevivencia de embriones de <i>rhinella arenarum</i> a partir del E25 cada 24 hs para la estación de monitoreo 3 durante 336 (h).....	- 89 -
Cuadro 10- Registro de sobrevivencia de embriones de <i>rhinella arenarum</i> a partir del E25 cada 24 hs para la estación de monitoreo 4 durante 336 (h)	- 90 -
Cuadro 11- Unidades de toxicidad crónica corto y toxicidad crónica (UTcc; UTc).....	- 104 -
Cuadro 12- Unidades de toxicidad aguda (UTa)	- 104 -
Cuadro 13- Registro de sobrevivencia de embriones de <i>danio rerio</i> a partir del e18-somite cada 24 hs para la estación de monitoreo 1 durante 336 (h)	- 115 -
Cuadro 14- Registro de sobrevivencia de embriones de <i>danio rerio</i> a partir del e18-somite cada 24 hs para la estación de monitoreo 2 durante 336 (h)	- 116 -

Cuadro 15- Registro de sobrevivencia de embriones de *danio rerio* a partir del e18-somite cada 24 hs para la estación de monitoreo 3 durante 336 (h) - 116 -

Cuadro 16- Registro de sobrevivencia de embriones de *danio rerio* a partir del e18-somite cada 24 hs para la estación de monitoreo 4 durante 336 (h) - 116 -

Cuadro 17- Unidades de toxicidad crónica corto y toxicidad crónica (UTcc; UTc) - 131 -

Cuadro 18- Unidades de toxicidad aguda (UTa) - 131 -

GLOSARIO Y ABREVIATURAS

ACUMAR: Autoridad de Cuenca Matanza Riachuelo.

ANFITOX: Batería de bioensayos de toxicidad estandarizados con embriones de anfibio.

ARCGIS: Software para procesar Sistemas de Información Geográfica.

CAA: Código Alimentario Argentino.

CL 50: Concentración letal media para el 50% de los organismos de ensayados.

COPs: Contaminantes Orgánicos Persistentes.

DBO: Demanda Biológica de Oxígeno.

DDT: Dicloro Difenil Tricoletano.

DQO: Demanda Química de Oxígeno.

E: Estadio del desarrollo embrionario.

EM: Estación de Monitoreo.

EPA: Agencia de Protección Ambiental (Environmental Protection Agency).

ICAS: Instituto de Ciencias Ambientales y Salud.

INDEC: Instituto Nacional de Estadísticas y Censos de la República Argentina.

IRAM: Instituto de Racionalización Argentino de Materiales.

ISCS AERMOD ISCT3: Simulador de Modelos de Dispersión de Aire.

IUCN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza.

NOEC: Máxima concentración que no produce efecto observable (del inglés: No Observed Effect Concentration).

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OPDS: Organismo Provincial para el Desarrollo Sostenible.

PROSAMA: Fundación Pro Salud y Medio Ambiente.

SA: Solución ANFITOX.

SNM: Sobre Nivel del Mar.

SSEE: Sustancias Solubles en Éter Etílico.

SZ: Solución ZEBRATOX.

TDS: Sólidos Disueltos Totales (Total Dissolved solids).

UI: Unidades Internacionales.

UT: Unidades de Toxicidad.

UTa: Unidades de Toxicidad Aguda.

UTc: Unidades de Toxicidad Crónica.

UTcc: Unidades de Toxicidad Crónica Corta.

ZEBRATOX: Batería de bioensayos de toxicidad estandarizados con embriones de pez zebrafish.

δ-ALAD: Ácido delta-aminolevulínico deshidratasa.

CAPÍTULO 1:

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Cuencas hidrográficas en la República Argentina

El término cuenca imbrífera, cuenca de drenaje o simplemente cuenca son distintas formas de denominar a la porción de territorio que drena por un único punto. El límite de una cuenca, llamado divisoria de aguas, está determinado por la forma del terreno (su relieve), y la separa topográficamente de las cuencas adyacentes. En términos hídricos, una cuenca hidrográfica es una unidad natural definida por las divisorias de aguas en un territorio dado, donde las aguas escurren superficialmente hacia un cuerpo de agua común (río, lago, mar). En cambio, cuando hablamos de cuenca hidrológica la asociamos a la unidad territorial en la cual el agua que cae por precipitación, el agua que escurre superficialmente, el agua que se almacena en superficie y en el perfil edáfico y el agua subterránea forman parte de un ciclo hidrológico común (Brieva, 2018).

También se puede definir a una cuenca hidrográfica como el área natural en donde se acumula el agua proveniente de las precipitaciones formando un cauce principal, las divisorias de agua son formadas naturalmente por los puntos más altos que encierran el río principal y los sistemas de cursos de agua que desembocan en él, formando así una unidad fisiográfica (Ramírez López, 2015).

En la actualidad el concepto de cuenca hidrográfica abarca más allá de sus límites naturales y sus características biofísicas, agregándole las diferentes relaciones que se generan entre los recursos naturales y los habitantes de la cuenca, que cambian de una cuenca a otra por las condiciones físicas, biológicas, económicas, sociales y culturales particulares de cada una. Los componentes biofísicos, biológicos y antropológicos que interrelacionan dentro de la cuenca deben estar en equilibrio, ya que al afectarse uno de ellos pone en peligro todo el sistema.

Es así que una cuenca es una fuente natural de captación de agua, con una realidad social propia establecida por las relaciones económicas, culturales, sociales y políticas que se establecen entre los diferentes grupos sociales. Transformándose en un sistema en el que interactúan sus componentes en el tiempo y el espacio, siendo el recurso hídrico el eje integrador (Ramírez López, 2015). En la cuenca se denota el desarrollo histórico de las poblaciones, intereses y hábitos, que definen la forma como se organiza el territorio y las diferentes prácticas productivas que se realizan.

Desde el punto de vista del drenaje de sus aguas, se pueden considerar varios tipos de cuencas:

Cuencas exorreicas, que vierten al mar. Pertenecen a dos grupos principales:

Vertiente o pendiente del Atlántico, que comprende la mayor parte del país. Está formada a su vez por tres sistemas principales:

- La parte Argentina de la Cuenca del Plata, en la parte norte, constituida por las cuencas del río Paraná, del río Uruguay y el Río de la Plata. Es la mayor del país.
- Los ríos de la parte central que vierten directamente al Atlántico, en su mayoría de la zona de Buenos Aires, hasta el río Colorado.
- Los ríos patagónicos, que descienden desde Los Andes, sin grandes afluentes y más o menos paralelos entre sí, desde el río Colorado hasta el río Grande de Tierra del Fuego.

Vertiente o pendiente del Pacífico, muy pequeña, formada por varias cuencas de ríos que cruzan Los Andes hacia Chile.

Cuencas endorreicas, o internas. Hay tres zonas principales:

- Cuenca central, formada por ríos de cuencas endorreicas o interiores que desagotan en lagunas o tierras pantanosas, o bien desaparecen de la superficie. Está formada por varios sistemas principales: el del río Desaguadero, el de la Mar Chiquita y el del río Quinto.
- Cuenca de La Pampa, corresponde a la región natural de la llanura pampeana y está compuesta por unos 20 (veinte) ríos de escasa importancia, siendo el más destacado el río Salado del Sur (640 km). En esta cuenca hay muchas zonas deprimidas, con pequeñas cuencas endorreicas e incluso varias zonas arreicas.
- Cuenca Andina, formada por los ríos que nacen en la cordillera que, salvo excepciones, se pierden en lagos, lagunas o esteros.

Cuencas arreicas, que carecen de cursos de agua o en las que es muy difícil determinar la divisoria de agua debido a su lento escurrimiento. Las más conocidas son las de las zonas semiáridas de las provincias del Chaco y La Pampa, así como también las mesetas patagónicas del origen basáltico y la Puna en el Noroeste.

Los ríos, los lagos, lagunas, torrentes, glaciares comprenden las aguas continentales. Esta agua dulce es un recurso renovable, pero escaso y sujeto a variaciones estacionales.

Tal es así, que al observar una superficie drenada por un río y sus afluentes nos estamos refiriendo a las cuencas hidrográficas. Esto se manifiesta con la interacción de elementos climáticos y las

distintas formas del relieve. La distribución de las precipitaciones y las temperaturas influye en la definición del régimen fluvial, es decir, en el comportamiento de los caudales a lo largo de un año, dependiendo también de la regularidad de las fuentes de alimentación.

El relieve incide en la forma en que los ríos vierten sus aguas, determinando una clasificación de las cuencas hidrográficas.

Cuando ocurre que todas las cuencas desembocan en un mismo mar u océano, conforman lo que llamamos vertiente. La mayoría de los ríos de nuestro territorio pertenecen a la vertiente atlántica. Es por esto, que cuando se estudian las cuencas en Argentina siempre se hacen agrupándolas desde su vertiente.

La cuenca exorreica de vertiente atlántica más importante de Argentina es la cuenca del Plata (*ver Fig. 1*). Sin embargo, si la excluimos los ríos que desembocan en este océano concentran el 11% de los caudales; exceptuando los del sur bonaerense. Esto se debe a que su origen proviene de los sistemas serranos de Tandil y Ventana, y los cuales se alimentan de los excedentes de agua provenientes de Los Andes, desembocando en el océano luego de atravesar extensas zonas áridas como ríos alóctonos (es decir, un río que se alimenta de las aguas de su nacimiento y no recibe afluentes en su recorrido).

Sumado a ello, el Negro, el Chubut, el Deseado, el Chico y el Santa Cruz; son los principales ríos patagónicos y que posteriormente desembocan en el océano Atlántico. Sus cabeceras se encuentran en los Andes patagónicos y sus caudales provienen tanto de las precipitaciones invernales como de los deshielos de primavera. A su vez, estos presentan lagos interpuestos en su curso, por lo que al abandonar este sector no reciben afluentes en su extenso recorrido hacia el mar.



FIGURA 1- CUENCA DEL PLATA: CUENCA EXORREICA DE VERTIENTE ATLÁNTICA MÁS IMPORTANTE DE ARGENTINA; ESTUARIO DEL RÍO DE LA PLATA. FUENTE: INSTITUTO NACIONAL DEL AGUA (INA)

Ahora bien, en cuanto a las cuencas de vertiente pacífica, estas representan solamente el 3% de los caudales del país. Ocupando reducidas superficies en Los Andes patagónicos. Tal es así, que el río más importante por su caudal es el Futaleufú, y el cual se represó para obtener energía necesaria en una planta procesadora de aluminio de Aluar (Puerto Madryn).

Por otra parte, las cuencas endorreicas representan apenas el 1% de los caudales, y junto a las arreicas definen la diagonal árida de nuestro país. En ellas, los ríos tienen caudales reducidos, aunque son de gran relevancia para las áreas que recorren, aprovechándolos de manera cuidadosa.

Además, estos ríos presentan serios problemas de erosión y deterioro de la cobertura vegetal ya que recorren tierras áridas. Estos problemas están vinculados, más allá de la falta de agua, al uso inadecuado del mismo.

La cuenca endorreica más importante es la del Desaguadero, no obstante, no siempre fue de este tipo, ya que antes tenía salida al océano atlántico a través del río Colorado. Pero la intensa utilización de los ríos de esta cuenca como proveedora de riego, sumada a características particulares en cuanto al clima, ha logrado su transformación definitiva hacia el endorreísmo.

Otra cuenca de este tipo y que es relevante para nuestro país, es la del río Salí o Dulce, la cual recoge sus aguas que descienden de las cumbres Calchaquíes y el Aconquija, desembocando finalmente en la laguna Mar Chiquita, en la provincia de Córdoba. Este río, al igual que los del Desaguadero, presenta sus mayores caudales en verano, porque se alimentan de las aguas de deshielo.

Por último, en cuanto a las zonas arceicas estas se visualizan en sectores particulares del país, como ser el noreste de Santiago del Estero y sudoeste de Chaco, o el centro-norte de La Pampa.

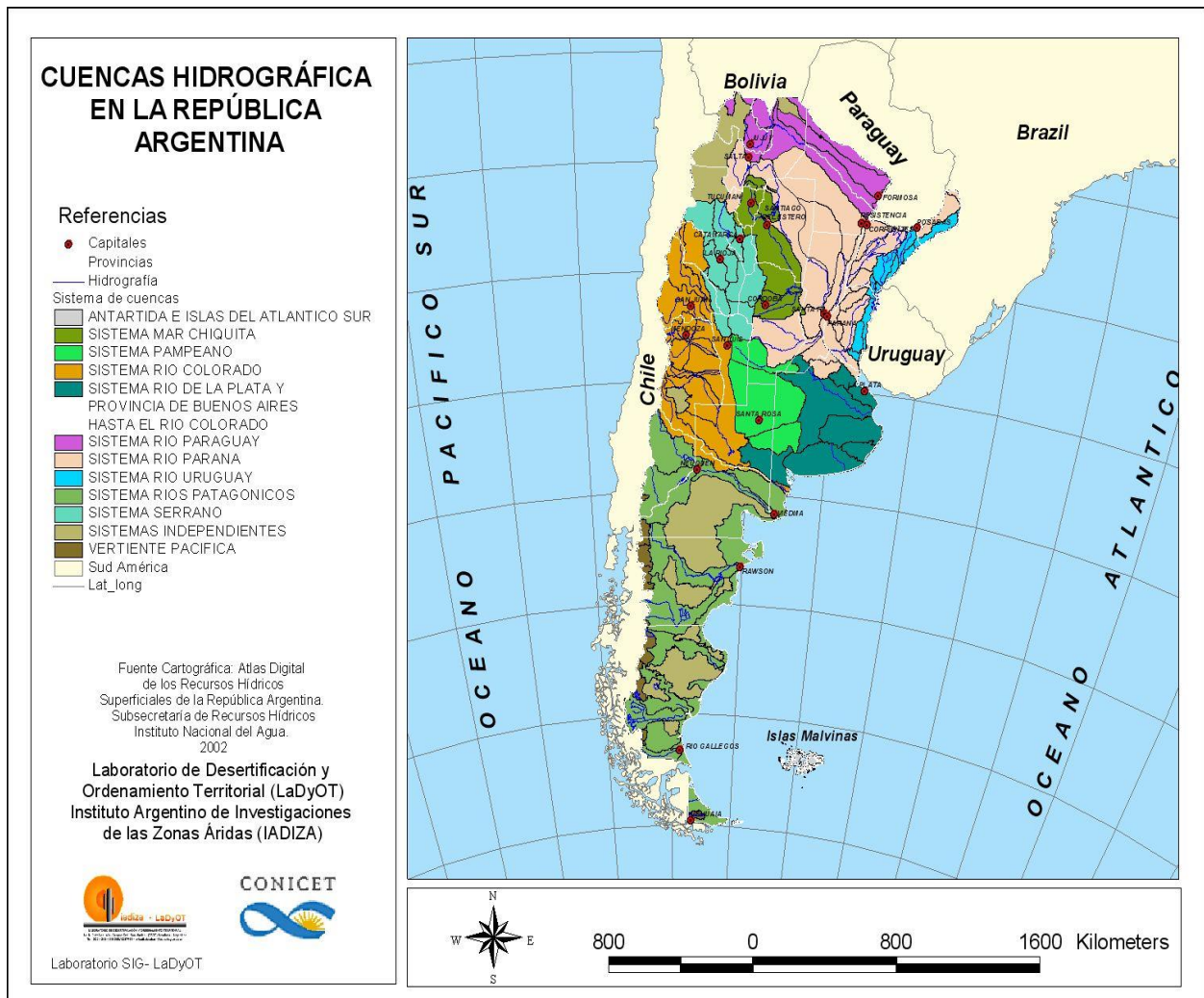


FIGURA 2- CUENCAS HIDROGRÁFICAS EN LA REPÚBLICA ARGENTINA FUENTE: CARTOGRAFÍA ATLAS DIGITAL DE LOS RECURSOS HÍDRICOS SUPERFICIALES DE LA REPÚBLICA ARGENTINA. SUBSECRETARÍA DE RECURSOS HÍDRICOS. INSTITUTO NACIONAL DEL AGUA 2002

1.2 Arroyo Las Conchitas: características de la cuenca

La cuenca hídrica del arroyo Las Conchitas se encuentra ubicada en el sur del Gran Buenos Aires. El curso principal de este arroyo tiene su nacimiento en el partido de Florencio Varela cercanías a la Unidad N°23 del Complejo Penitenciario a 25 m snm ($34^{\circ}55'54.72''S$; $58^{\circ}15'19.73''O$), atravesando todo este partido como así también el de Berazategui hasta su desembocadura en las aguas del estuario del Río de La Plata ($34^{\circ}44'57.97''S$; $58^{\circ}8'40.93''O$).

Aunque uno de sus afluentes tiene sus nacientes en el extremo sur del partido de Berazategui, aproximadamente a 27 m snm. El curso principal corre en paralelo a las vías del ramal ferroviario Villa España - Sourigues, aproximadamente a 1,5 km al Este del mismo. Cerca del Cementerio Municipal recibe un afluente sobre su margen derecha que nace en las cercanías de la localidad de Juan Maria Gutiérrez y atraviesa el Club de Campo "El Carmen". Desde la localidad de Plátanos al cruzar las vías del Ferrocarril Metropolitano, atravesando en parte la Llanura Costera hasta su desactivación en su vertiente (Hurtado, y otros, 2006). Según el último censo realizado posee una población estimada de 700.000 habitantes (INDEC, 2010) y una longitud de 25,8 km².

En su cuenca alta, predominan áreas con gran actividad agrícola - ganadera y un Parque Ecológico Cultural (Guillermo Enrique Hudson), con poca intensidad industrial; en cambio, su cuenca media está sumamente afectada por zonas industriales con establecimientos de alta complejidad ambiental comprendidos dentro de la tercera categoría ambiental según Decreto 531/19 reglamentario de la Ley 11.459/96 (OPDS, 1996) como ser: curtiembres, fábricas de pinturas, lacas y barnices, fábrica de pesticidas de uso agrícola, recuperadora de baterías, químicas y residenciales intercaladas. Y en la cuenca baja del arroyo próximo a su desactivación en las aguas del estuario del Río de la Plata recibe gran parte de los efluentes líquidos vertidos por los Country y Barrios Cerrados de la zona.

1.2.1 Topografía

Para comprender la dinámica del escurrimiento superficial, la distribución de las formas más significativas del terreno y su relación con el tipo de suelos de un área, resulta imprescindible conocer su relieve. La herramienta más práctica para representar las diferencias del relieve en dos dimensiones son las curvas de nivel, las cuales unen puntos de igual altura. Constituyen la proyección de la intersección del terreno con planos horizontales imaginarios separados por intervalos verticales iguales. La distancia vertical entre curvas contiguas se denomina

equidistancia. En las curvas de nivel de las cartas del Instituto Geográfico Nacional (IGN) correspondiente a la zona de estudio es de 1,25 m (Hurtado, y otros, 2006).

La interpretación de las curvas de nivel permite apreciar un rasgo fundamental del relieve, como es la pendiente o inclinación del terreno. Las pendientes se definen de acuerdo con tres parámetros: gradiente, longitud y forma. Gradiente es el ángulo que forma el terreno respecto a un plano horizontal ideal. Se puede medir en porcentaje o en grados sexagesimales. Longitud es la distancia entre la parte superior y la base del plano inclinado. Forma: es la disposición del terreno: cóncavo, convexo, plano, o una combinación de tales formas. La distancia horizontal entre curvas de nivel sucesivas permite tener una idea de las pendientes dado que cuanto más cercanas se encuentran, mayor es la pendiente. Por el contrario, cuanto más separadas se hallan, el terreno es más plano. Por otra parte, la manera en que se disponen las curvas permite deducir la forma de las pendientes (convexa, cóncava), lo cual determina, junto con el gradiente la manera en que se distribuye el agua de escurrimiento (Hurtado, y otros, 2006).

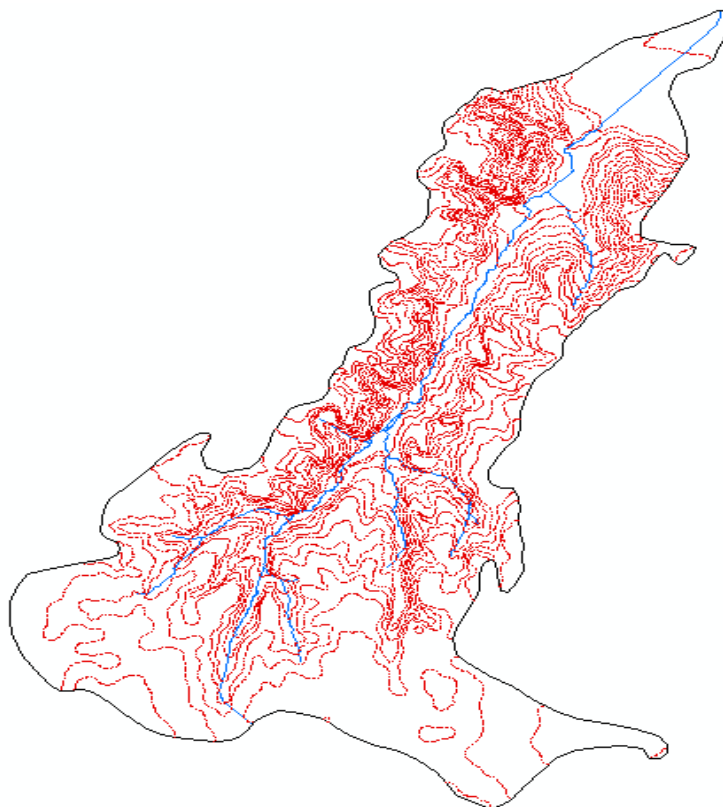


FIGURA 3- CURVAS DE NIVEL CUENCA HÍDRICA ARROYO LAS CONCHITAS. FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA EN ARCGIS

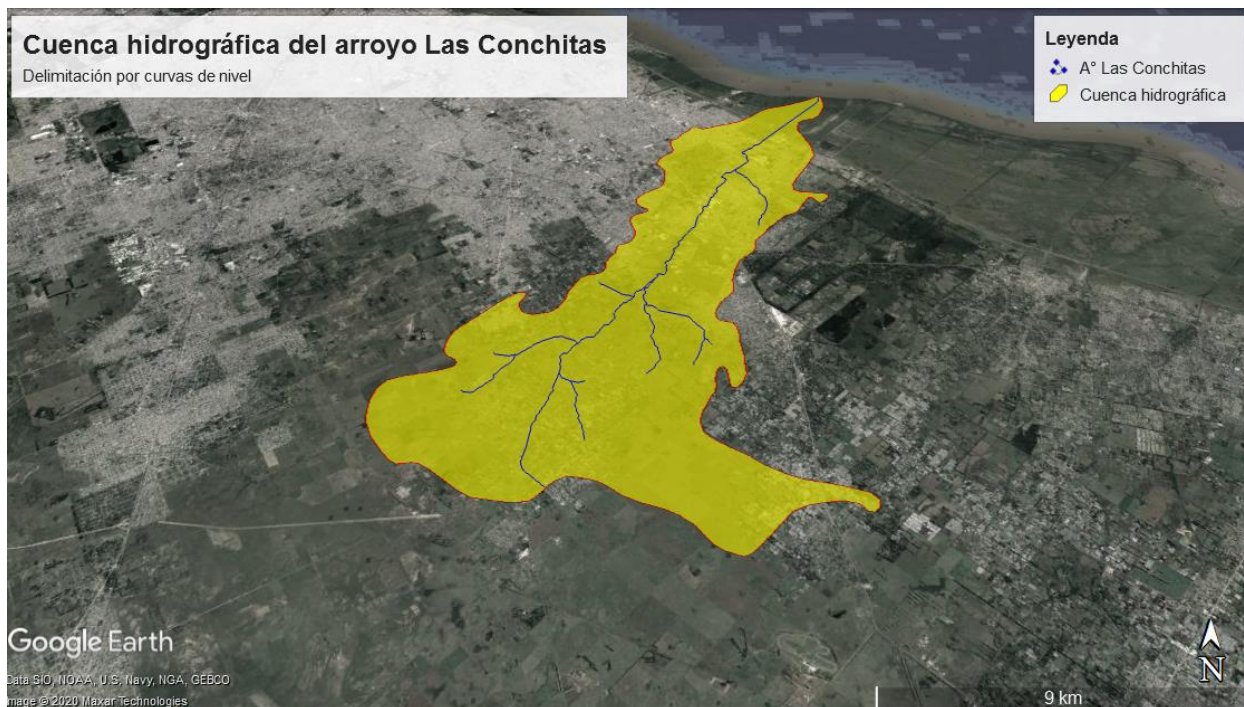


FIGURA 4- CUENCA HIDROGRÁFICA DEL ARROYO LAS CONCHITAS DELIMITADA POR CURVAS DE NIVEL. FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

1.2.1.1 Características topográficas del área en estudio

Es posible diferenciar dos zonas totalmente diferentes que responden a su caracterización geomórfica: la Llanura Costera y la Llanura Alta.

La Llanura Costera, ocupa el sector norte y se extiende aproximadamente entre la cota de 5 m snm y la costa del Río de la Plata. Se trata de una zona de relieve plano a plano - cóncavo, con pendientes en general inferiores a 0,03 %, con importantes sectores deprimidos con diseño de drenaje anárquico. Se encuentran aquí las cotas más bajas del partido de Berazategui, aproximadamente. La llanura costera se vincula a la llanura alta a través de un “escalón”, hoy en parte disimulado por la erosión y la actividad antrópica, cuya pendiente oscila generalmente entre 1 y 2 % (Hurtado, y otros, 2006).

La Llanura Alta comprende casi las dos terceras partes del área, situada por encima de la cota de 5 m snm. En el extremo sur, en un interfluvio plano, localizado al sur de la Ruta Provincial N°36, se encuentra la divisoria de aguas principal, a partir de la cual descienden las alturas desde los 30 m snm hacia el NE hasta cotas próximas a los 5 m snm en el borde interior de la Llanura Costera. A partir de esta divisoria se desarrollan las dos vertientes principales: la del Río de la Plata hacia el NE, que se encuentra representada en todo el territorio del partido y la del río Samborombón

hacia el S, la cual no tiene expresión real. En la primera, los interfluvios, pendientes y valles se encuentran generalmente bien definidos, pudiéndose apreciar diferencias en la orientación de geoformas, cursos y magnitud de las pendientes. Se reconocen además varias divisorias secundarias que se desprenden de la principal, y que dividen las cuencas con dirección SO-NE, dispuestas en forma subparalela entre sí. Estos interfluvios tienen forma generalmente convexa, ancho de 1-2 km y dirección aproximada SO-NE. Los perfiles longitudinales varían en altura de 27-10 m snm hacia el NO a 20-10 m snm en el SE, con pendientes longitudinales que oscilan entre 0,15 y 0,25 %. Las pendientes que vinculan los interfluvios con las planicies de inundación son cortas (100 a 300 m) y su gradiente varía aproximadamente entre 0,80 y 1,10 % (Hurtado, y otros, 2006).

1.2.2 Hidrología superficial

Las características impuestas por la infraestructura urbana e industrial y las profundas modificaciones que ésta introduce en el ciclo hidrológico, hacen que esta zona deba ser considerada como una región eminentemente antropizada.

Los aspectos hidrológicos entran en su mayor parte dentro de los temas de la hidrología urbana. Los ríos y arroyos poseen, en general, un régimen permanente y originalmente exhibía un carácter efluente respecto a las aguas subterráneas; sin embargo, actualmente han tornado influentes por la intensa explotación de las aguas subterráneas en las áreas densamente urbanizadas. Los cursos ofrecen planos aluviales, más dilatados hacia la desembocadura, en la Planicie Costera correspondiente al propio Río de la Plata.

En relación con el drenaje superficial de la región, se deben distinguir los mismos ámbitos ya identificados al describir la topografía: la Planicie Costera y la Llanura Alta. Dentro de ésta última, las cuencas de los arroyos de la vertiente del Río de la Plata (*ver Fig. 5*) son los que ocupan prácticamente toda la superficie. La vertiente del río Samborombón ocupa una muy pequeña superficie en el extremo sur del partido de Berazategui. Allí no se han reconocido vías de drenaje encauzado. Sólo se observan algunas cañadas y cubetas que concentran el agua de escurrimiento durante las épocas de lluvias intensas (Hurtado, y otros, 2006).

que afectan positiva o negativamente la calidad y cantidad del agua, la capacidad de adaptación de los ecosistemas y la calidad de vida de sus habitantes (*ver Fig. 6*).

Si consideramos las externalidades generadas por distintas actividades humanas constatamos que el papel de cada actividad y, por ende, de cada actor es diferente en relación con su posición en la cuenca (cuenca arriba/aguas arriba o cuenca abajo/aguas abajo). Los movimientos de agua, suelos, nutrientes y contaminantes provenientes de distintas partes de una cuenca crean una conexión física entre poblaciones distantes unas de otras (Swallow, Johnson, & Meinzen-Dick, 2001).

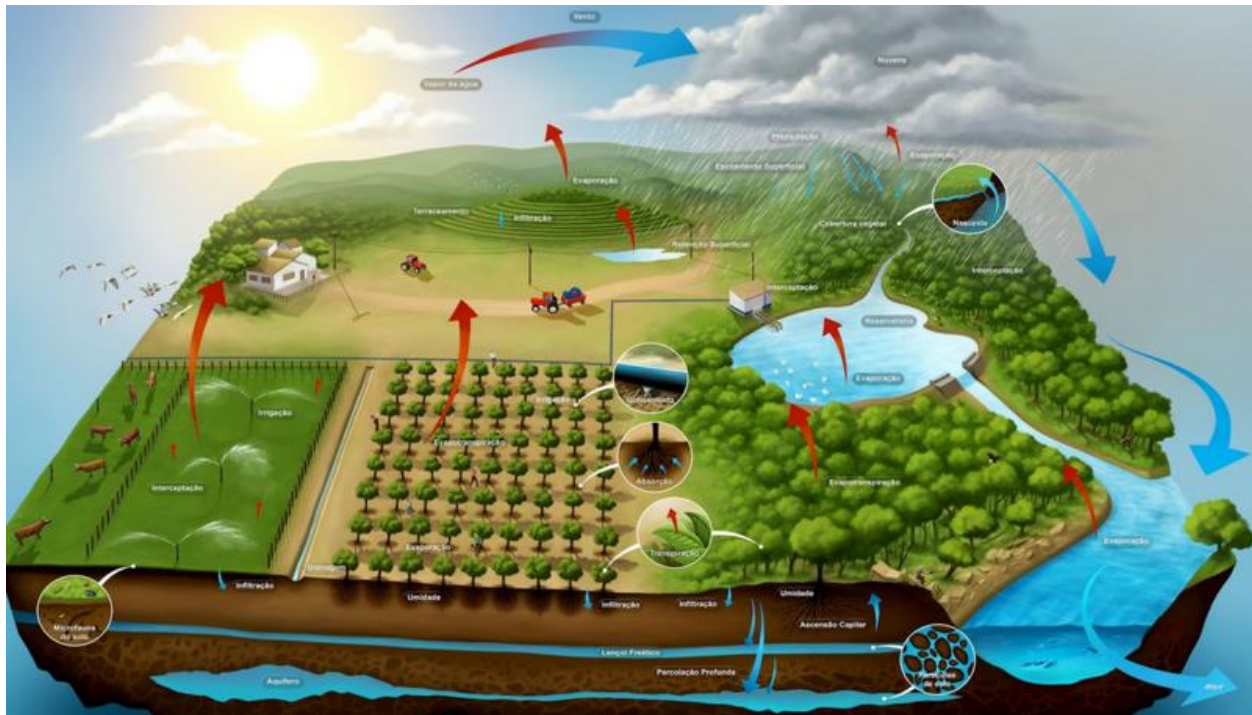


FIGURA 6- HISTORIA DEL AGUA Y MITOS DEL CICLO HIDROLÓGICO FUENTE: HIDROGEO CORPORATION

Cuando una cuenca, se constituye por múltiples arroyos y ríos, y presenta características naturales y/o antropogénicas disímiles, es conveniente subdividirla, con la finalidad de permitir una gestión específica a cada una.

Esta subdivisión en unidades más pequeñas denominadas subcuencas, está conformada por afluentes secundarios que confluyen hacia el cauce principal.

En el caso del arroyo Las Conchitas, todas sus aguas confluyen a su inactivación en la vertiente del Río de La Plata conjuntamente con la de sus afluentes.

En función de las diversas características que predominan en cada región de la cuenca, ésta ha sido subdividida conceptualmente en tres áreas: Cuenca Alta, Cuenca Media y Cuenca Baja.

Cuenca alta, con áreas aledañas a la divisoria de aguas en la porción altimétrica más elevada de la cuenca. En esta zona se forman los primeros escurrimientos luego que los suelos han absorbido y retenido toda el agua según su capacidad.

Cuenca media, una zona de transición entre la cuenca alta y la cuenca baja, donde los escurrimientos iniciales confluyen aportando diferentes caudales cuyas concentraciones de sedimentos, contaminantes y materia orgánica diferirán en función de las actividades que se realizan en cada subcuenca; es un área de transporte y erosión.

Cuenca baja, el sitio donde el cauce principal desemboca en el mar, en un lago o bien un río. Se caracteriza por ser una zona de importantes ecosistemas, como los humedales terrestres y costeros, además de muy productiva para el uso agrícola y donde se acumulan los impactos de toda la cuenca.



FIGURA 7- IMPACTO ACUMULADOS DE LAS ACTIVIDADES HUMANAS EN UNA CUENCA HIDROGRÁFICA FUENTE: ACUMAR (AUTORIDAD DE CUENCA MATANZA-RIACHUELO)

Para el caso en cuestión, la cuenca hidrográfica del arroyo Las Conchitas, se realizó un análisis a través de sus curvas de nivel con el software ArcGis 10.5 y de su perfil de elevación en Google Earth Pro.

Se pudo determinar el perfil divisorio entre la cuenca alta, cuenca media y cuenca baja; logrando por primera vez subdividirla en 3 (tres) partes acorde a sus características geográficas.

Perfil divisorio cuenca alta-cuenca media

Latitud 34°51'6.90"S; Longitud 58°13'12.87"O

Perfil de Elevación: 12 m snm a 14.7 km de su vertiente.

Inclinación promedio: 0.8%

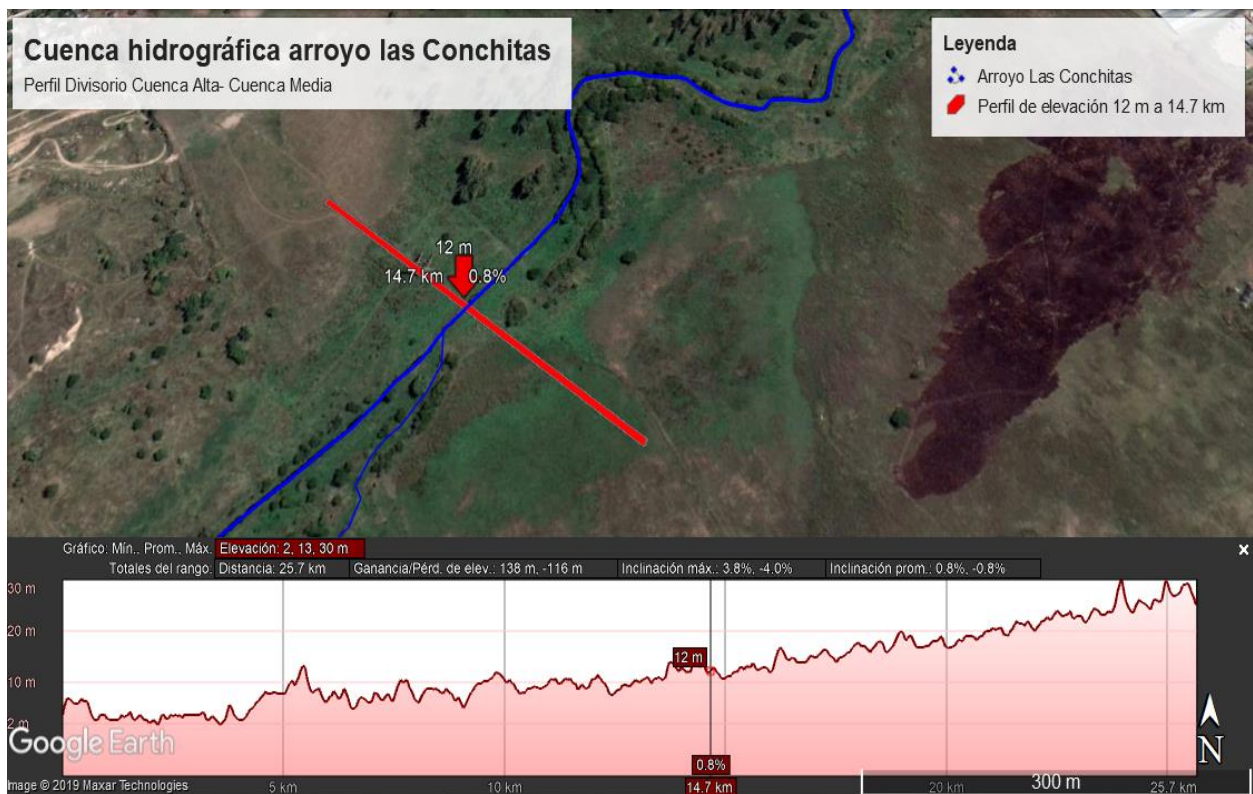


FIGURA 8- PERFIL DIVISORIO CUENCA ALTA; CUENCA MEDIA FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

Perfil divisorio cuenca media-cuenca baja

Latitud 34°47'27.34"S; Longitud 58°10'49.81"O

Perfil de Elevación: 7 m snm a 6.02 km de su vertiente.

Inclinación promedio: 1.0 %



FIGURA 9- PERFIL DIVISORIO CUENCA MEDIA; CUENCA BAJA FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

Gracias a esto, se pudo calcular el área afectada en km² (kilómetros cuadrados) correspondiente a cada subcuenca, delimitando las mismas a través de sus curvas de nivel y los perfiles de elevación obtenidos (ver Fig.10).

Cuenca alta: área aproximada 86,0 km² (62 %)

Cuenca media: área aproximada 38,2 km² (27 %)

Cuenca baja: área aproximada 14,9 km² (11 %)

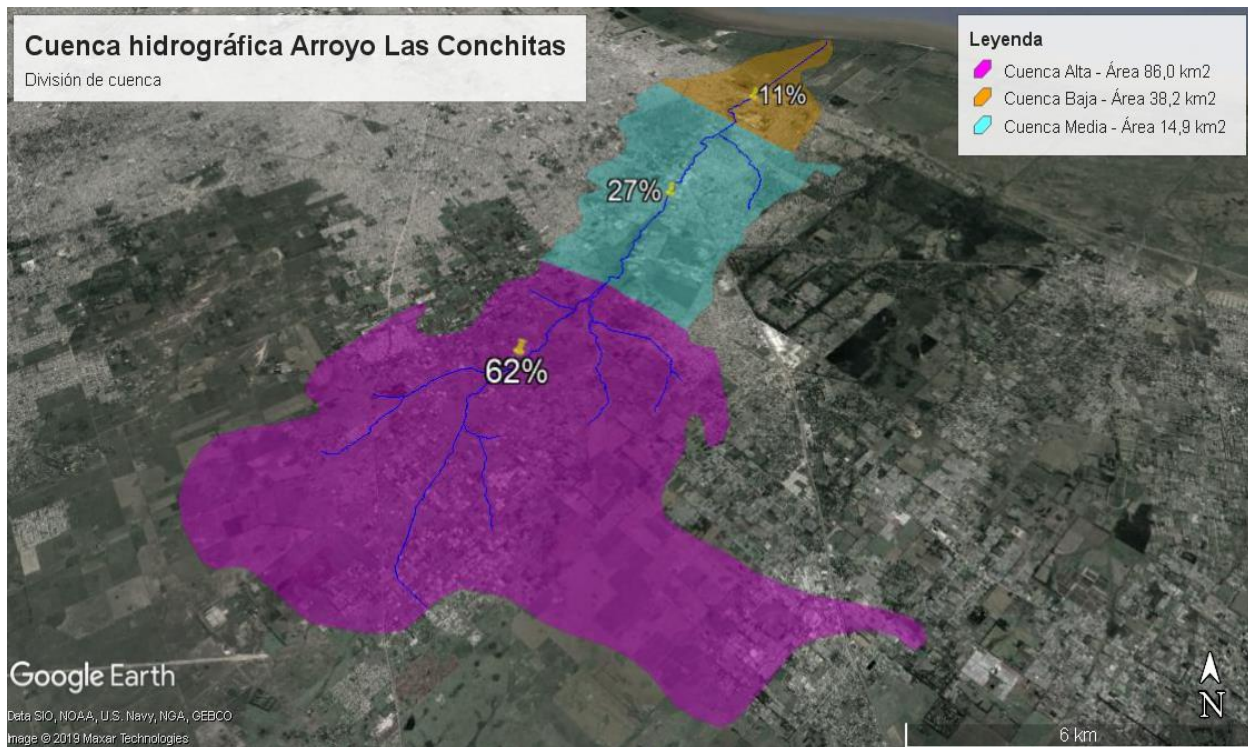


FIGURA 10- DIVISIÓN DE LA CUENCA HIDROGRÁFICA DEL ARROYO LAS CONCHITAS EN RELACIÓN A SUS CURVAS DE NIVEL. FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

1.4 Evolución de la problemática en la cuenca desde 1997

La calidad del agua superficial se encuentra condicionada por un conjunto variado de procesos naturales y de actividades antropogénicas que interaccionan entre sí de manera directa o indirecta; por lo tanto, la misma se vincula o asocia con los diferentes usos del territorio que se desarrollan en una cuenca y del recurso hídrico en sí mismo (Salvioli, Colli, Cipponeri, & Calvo, 2012).

Históricamente la cuenca hídrica del arroyo Las Conchitas ha sufrido el impacto de los distintos tipos de industrias que radicarón y radican en ella, como así también de la población que la habita en sus márgenes.

Como consecuencia de esto, en el año 1997 la antigua Secretaría de Política Ambiental de la provincia de Buenos Aires declaró en estado de “Emergencia Ambiental” al arroyo Las Conchitas y al barrio La Rotonda con el fin de evitar que se radiquen nuevos establecimientos industriales en la zona y así mitigar el impacto ambiental.

Debido al desinterés político de los municipios que involucran la cuenca; erradicar industrias solo fue una utopía.

1.4.1 Judicialización de la cuenca

En año 2006 se crea el “Comité de Crisis Ambiental” conformado en su momento por la antigua Secretaria de Política Ambiental de la provincia de Buenos Aires (actualmente Organismo Provincial para el Desarrollo Sostenible), como máxima autoridad con competencia en el tema, Autoridad del Agua (ADA), gobierno municipal (Secretaria de Salud, Secretaria de Gobierno, Secretaria de Obras y Servicios Públicos) y vecinos del barrio La Rotonda y San Rudecindo.

Donde mediante la Resolución N° 1127/06 del Organismo Provincial para el Desarrollo Sostenible (OPDS), se ratifica el estado de “Crisis Ambiental” afectado al curso hídrico del arroyo Las Conchitas y su zona de influencia.

Impulsado por un estudio de investigación realizado por la Universidad Nacional de La Plata, se determinó que las actividades industriales de la zona estarían directamente vinculadas con los altos índices de toxicidad encontrados en la población que habita en los márgenes de la cuenca (Giannuzzi & Godoy, 2006).

Este hecho tomo conocimiento público por lo que los vecinos de los barrios damnificados a modo de protesta cortaron la Ruta Provincial N°36. Cansados de efectuar reclamos frente a las autoridades pertinentes sin obtener respuestas.

La función de este comité constaba en realizar una evaluación crítica de la problemática ambiental y del impacto de la misma sobre la salud de los habitantes. Tras varios meses de inactividad y denuncias por hechos de corrupción sobre funcionarios públicos la integraban; este comité fue disuelto, quedando acéfala la problemática nuevamente.

1.4.2 Contaminación ambiental con plomo en el Barrio La Rotonda- Florencio Varela

1.4.2.1 Situación

El Barrio La Rotonda se encuentra ubicado en el km 32.5 de la Ruta Provincial N°36, del partido de Florencio Varela, provincia de Buenos Aires (*ver Fig. 11*). Está formado por 32 (treinta y dos) manzanas y tiene una población de alrededor de 3.500 habitantes, en su mayoría niños (INDEC, 2010). Lindante a la zona residencial se encuentran emplazadas 22 (veintidós) industrias encuadradas dentro de segunda y tercera categoría ambiental (OPDS, 1996); entre ellas, rubros como ser; curtiembres, fábricas de pinturas, lacas y barnices, una fábrica de pesticidas de uso agrícola y una recuperadora de baterías.

de corte establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) ($10 \mu\text{g/dL}$). En lo que respecta a la población adulta, solo se encontraron dos individuos con plumbemia superior a los intervalos de referencia ($2\text{-}15.2 \mu\text{g/dL}$ en mujeres, $3.1\text{-}17.7 \mu\text{g/dL}$ en varones) (Giannuzzi & Godoy, 2006). Los resultados del relevamiento que llevó a cabo la Secretaria de Salud del municipio de Florencio Varela determinaron que un 19.4% de los menores de 15 años (36 casos de 185 analizados) y un 2.5% de mayores de 15 años (4 casos de 158 analizados) se encontraban con plumbemia por encima de $10 \mu\text{g/dL}$. Los valores encontrados se ubican entre 10 y $48 \mu\text{g/dL}$.

Como potencial fuente de contaminación de dicho metal se encuentra la firma Industrial Varela S.A (actual Industrial Varela SRL) (ver Fig.12), industria dedicada a la recuperación y refinamiento de plomo a partir de baterías. La misma se ubica en la entrada del barrio La Rotonda, lindando directamente con la población. Uno de los niveles de plomo en sangre más elevado encontrado en el muestreo corresponde a un infante que vive frente de la empresa.

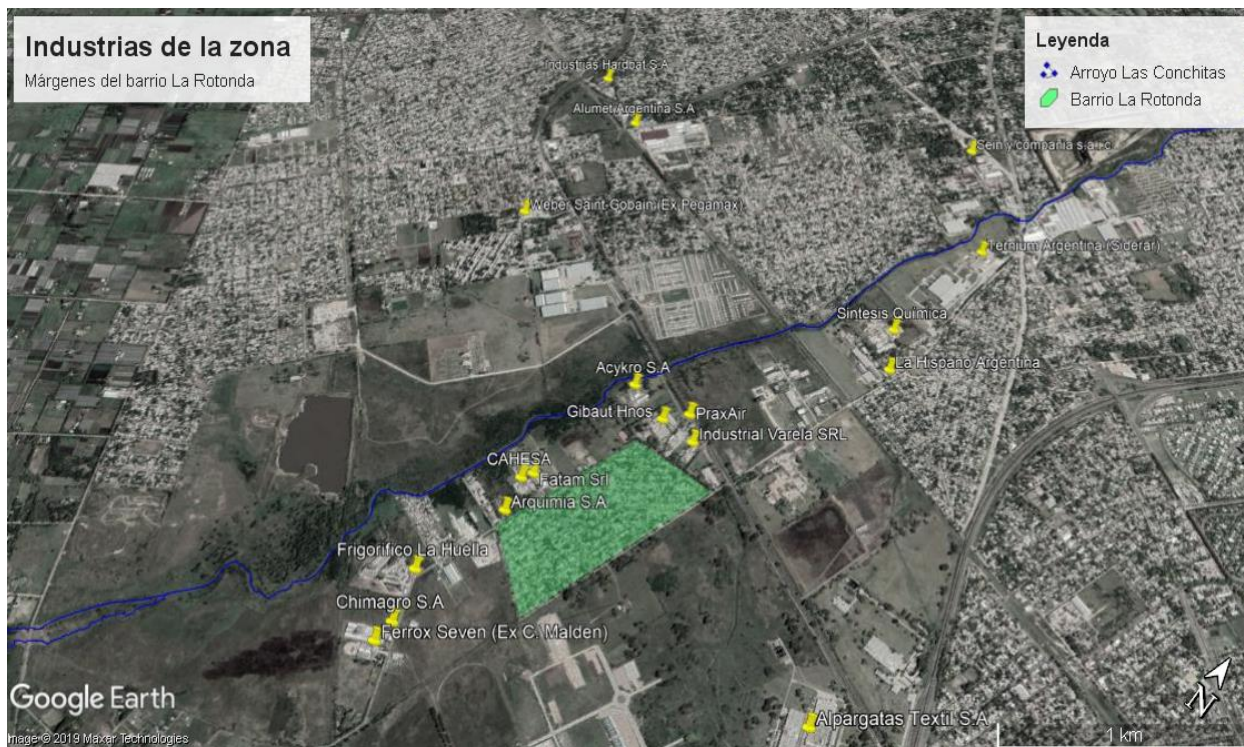


FIGURA 12- EMPRESAS RADICADAS EN LOS MÁRGENES DEL BARRIO LA ROTONDA FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

Al realizar la distribución geográfica de los casos de niveles tóxicos de plomo en sangre sobre el plano del barrio se observa una distribución bastante homogénea, aunque muestra concentración de casos en el anillo de una cuadra a la redonda con centro en la firma Industrial Varela SRL.

El Taller de Control de Potabilidad de Aguas de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, realizó un estudio de la calidad del agua al que la población accede habitualmente (agua subterránea), además de realizar una inspección visual de todo el barrio y del cordón industrial que lo rodea. Las conclusiones del Taller fueron contundentes, al informar que las industrias “no cumplen con las exigencias de tratamiento y manejo de los residuos generados: se presencian emisiones gaseosas, destrucción de caminos, procesos de producción incompatibles con la proximidad de la población y producción de alimentos”. El 20% de las muestras de agua resultó ser potable, mientras que el 80% restante no cumplió con los estándares de potabilidad.

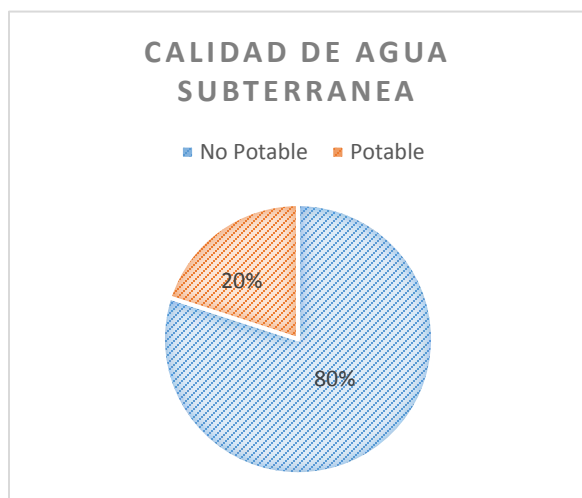


FIGURA 14- DISTRIBUCIÓN DE AGUA POTABLE SEGÚN CAA

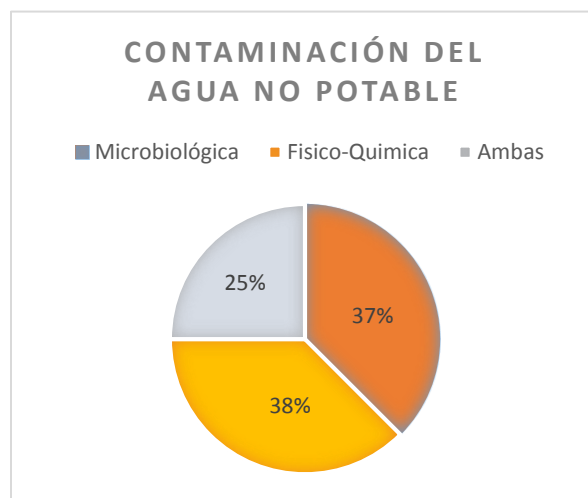


FIGURA 13- DISTRIBUCIÓN DE LOS CONTAMINANTES

De las muestras no potables, el 37.5% presentó contaminación de tipo microbiológico con presencia de bacterias Coliformes, Escherichia Coli y Pseudomonas aeruginosa; el 25% de las muestras presentó contaminación físico-química con presencia de nitratos en muy altos valores, llegando en algunos casos a 154 mg/l (el nivel máximo es de 45 mg/L). El 37.5% de las muestras presentó contaminación fisicoquímica y microbiológica.

Para dar un acabado enfoque de la realidad, el informe también expuso: “Es de destacar que el análisis de potabilidad de aguas de la muestra N°5 perteneciente a la Sala de Atención primaria Dr. Mandirola, Sociedad de Fomento y Jardín de Infantes ubicado en la calle Grierson y La Rotonda resultaron ser no potable debido a contaminación de tipo microbiana con presencia de Coliformes en niveles mayores a los máximos permitidos, así como presencia de Pseudomonas aeruginosa. “En lo que respecta al análisis de plomo en agua (se analizó plomo soluble únicamente) se encontraron niveles por debajo del máximo permitido por el Código Alimentario Argentino (CAA), sin embargo, no hay que descartar que en un futuro cercano estos valores puedan

modificarse debido a que los niveles encontrados de plomo en suelo fueron muy elevados y pueden lixiviar a las capas subterráneas de aguas próximamente”.

El análisis del contenido en plomo del suelo en distintos puntos del barrio realizado por la Dirección de Industrias del municipio mostró una distribución muy heterogénea del tóxico, pero reveló un nivel de 10.099 mg/Kg en la muestra tomada frente de la empresa Industrial Varela SRL, sobre la calle Berni. Este nivel de plomo supera 10 veces el máximo permitido para suelo de uso industrial (1.000 mg/Kg) y 20 veces el nivel máximo para suelo de uso residencial (500 mg/Kg). Esta calle ha sido rellenada con desechos industriales por esta misma empresa, en abuso del desconocimiento de la población y sin previa caracterización ni permiso de las autoridades, ya que se trata de un residuo peligroso.

El análisis de plomo en material particulado en aire, realizado por la Secretaria de Política Ambiental oportunamente, no mostró niveles por encima de lo permitido al momento de realizar el muestreo. No obstante, este análisis fue objetado por haberse realizado en condiciones que no corresponden a la realidad cotidiana del barrio: la muestra fue tomada durante dos días, tiempo en el cual la empresa Industrial Varela SRL no se encontraba en funcionamiento.

La Secretaria de Industria del municipio aplicó el modelo ISCS AERMOD ISCT3 para estimar la concentración de inmisión y deposición de plomo sobre el territorio del barrio La Rotonda tomando como foco puntual emisor a la empresa Industrial Varela SRL. El estudio estableció que se superaron los niveles máximos establecidos como norma para calidad de aire.

La Secretaria de Política Ambiental también realizó un relevamiento del curso de agua del arroyo Las Conchitas en su momento y el mismo reveló una elevada contaminación biológica y química, comparable en varios aspectos con la realidad que atraviesa la cuenca Matanzas-Riachuelo (Giannuzzi & Godoy, 2006).

1.4.3 Denuncia penal por contaminación en Florencio Varela

En el año 2012, se efectuó una denuncia penal por contaminación ambiental en Florencio Varela, redactada por los diputados provinciales del partido político de aquel momento ARI (Afirmación para una República Igualitaria), Horacio Piemonte, Walter Martello, Mario Fabris y Sebastián Cinquerrui; presentada ante la mesa de entrada de la Cámara de Diputados de la provincia de Buenos Aires.

Dicha denuncia constó de varias carillas en las que se describieron hechos de presunta contaminación publicados en el periódico local “Varela al Día” y “La Colmena” a fin de que la justicia libre oficios a sus directores y den cuenta de la verosimilitud de sus artículos.

“Los fundamentos que dieron lugar a esa denuncia, se vinculan con los hechos de contaminación ambiental que se han manifestado, en los distritos bonaerenses de Florencio Varela y Berazategui, que por su pronunciada gravedad tomaron estado público y derivó en la aceptación por parte del estado provincial de un estado de “Crisis Ambiental” que se genera en el polo industrial ubicado en el perímetro que limita entre la Avenida Guillermo Hudson, la calle 1356 y la Ruta Provincial N°36 Km 32 (Barrio La Rotonda). Como así también el desastre ecológico producido por la presunta utilización ilegal de residuos peligrosos contaminantes en la zona de la reserva del Parque Ecológico Guillermo Hudson. Ambos puntos, con el factor común de encontrarse a escasos metros del arroyo Las Conchitas.”

En la causa se imputaron a empresas de alta complejidad ambiental que se encuentran radicadas en la zona de influencia desde hace varios años. Entre ellas, se destacan por resultar particularmente pertinentes, los rubros que están dedicados al sector curtiembre, la fabricación y reciclado de baterías, y a la fabricación de pesticidas, rubros complejos que si no cuentan con una fiscalización del estado podrían llegar a ser potencialmente peligrosas.

La gran mayoría de las empresas del polo industrial generan efluentes líquidos producto de sus procesos industriales, y deberían contar con sistema de tratamiento acorde a las características del efluente generado para posterior vertido del efluente al cuerpo superficial del arroyo Las Conchitas y/o sobre suelo natural, ya que este arroyo atraviesa en su totalidad la zona industrial.

Del análisis del expediente individualizado con el N° 2145 - 5.313/06, “Creación del comité de crisis ambiental de la zona de influencia al arroyo Las Conchitas”, de trámite ante la Secretaría de Política Ambiental, más allá de lo acotado de los estudios realizados con claridad el estado de desastre que se denunció y dan sustento fáctico a la presente denuncia penal.

La aparición de cuadros sintomatológicos asociados a la contaminación con plomo, motivó estudios toxicológicos que arrojaron valores altísimos de “plomo” y “cromo” en sangre (Giannuzzi & Godoy, 2006). Estos valores superaron los máximos permitidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), tanto en adultos como en menores, lo que conducen inevitablemente a producir cuadros de plumbemia y encefalopatía subaguda y crónica irreversible. Agregando además, que del estudio de distintas sintomatologías respiratorias, dérmicas y neurológicas sufridas por los

habitantes de los barrios contaminados, se pudo detectar como causal de tales manifestaciones patológicas la presencia de distintos contaminantes en el organismo, correspondientes a los residuos contaminantes de las empresas del parque (Giannuzzi & Godoy, 2006).

Como ha ocurrido en otras oportunidades, tardíamente el gobierno provincial dispuso con posterioridad a la consumación de los siniestros que su propio accionar provoca, medidas paliativas y un compromiso que cubre hacia el futuro lo que debió ser prevenido por sus actos.

Así es que se conforma un “Comité de crisis ambiental de la zona de influencia al arroyo Las conchitas”, por resolución N° 1191/06 del expediente N° 2145-5313/06 (Varela Al Día, 2012).

1.5 Objetivos generales

Será objetivo principal de este trabajo determinar, integrando estudios de ecotoxicidad y un relevamiento de parámetros físicoquímicos, la variación temporal del impacto antropogénico generado en la región.

Por ello, es fundamental realizar un estudio ecotoxicológico en la cuenca hídrica del arroyo Las Conchitas con embriones de vertebrados.

Son objetivos secundarios de este:

- interpretar los resultados de toxicidad obtenidos y compararlos con un estudio ecotoxicológico realizado en la cuenca en el año 2002 (Herkovits, y otros, 2003).
- comparar los resultados físicoquímicos obtenidos con los valores guía de referencia establecidos por el marco legal en la República Argentina.
- subdividir la cuenca hídrica en función de las curvas de nivel obtenidas con el software ArcGis 10.5 en: cuenca alta, cuenca media y cuenca baja.
- realizar una zonificación de la cuenca en función de las distintas actividades antropogénicas que predominan en toda su extensión.

CAPÍTULO 2:
ECOTOXICOLOGÍA; UNA
HERRAMIENTA DE GESTIÓN
SUSTENTABLE PARA CUENCAS
HÍDRICAS

2.1 Aportes de la ecotoxicología a las regulaciones ambientales

2.1.1 Antecedentes de Ecocidio (Tragedia en la Bahía de Minamata y la declinación de poblaciones de aves silvestres)

El surgimiento de la ecotoxicología se relaciona con dos episodios que se produjeron como consecuencia de la contaminación del ambiente con sustancias químicas: la enfermedad de Minamata causada por el mercurio y la declinación de las poblaciones de aves silvestres por efecto de los plaguicidas clorados.

En el año 1950, en Japón, una empresa productora de acetaldehído que utilizaba mercurio como catalizador, vertía sus efluentes sin tratamiento en la Bahía de Minamata. El mercurio, que es muy tóxico, se bioacumuló en los organismos y se transfirió a través de la cadena trófica marina, teniendo lugar un proceso de biomagnificación.

Como resultado se produjo un aumento de la concentración del mercurio en aquellos organismos que ocupaban los niveles superiores de la cadena trófica, como peces predadores y aves piscívoras. Cientos de personas se intoxicaron por comer peces contaminados con mercurio, lo cual provocó la muerte de muchas de ellas y dejó secuelas de por vida a otras. La enfermedad de Minamata se puso de manifiesto cuando se enfermaron las personas; sin embargo, previamente se habían observado cambios en la vida marina, peces muertos, pulpos flotando, aves que se precipitaban al agua en pleno vuelo, y ataques en animales domésticos (gatos). Pero al no conocerse la causa de estos cambios no pudieron interpretarse esos hechos como una advertencia de lo que ocurriría luego con la población humana (Yacuzzi, 2008).

Otro ejemplo, el DDT un compuesto orgánico clorado empleado como insecticida, se comenzó a usar durante la segunda guerra mundial. Altamente tóxico, que permanece como tal en el ambiente durante mucho tiempo porque casi no se degrada y, al igual que el mercurio, se bioacumula y biomagnifica. Durante las décadas del 50 y 60, se observó una declinación de las poblaciones de aves silvestres en el hemisferio norte; se identificó al DDT y a otros pesticidas clorados usados en la agricultura como los agentes causantes de ese efecto (Carson, 1962).

Estos dos hechos (la tragedia de Minamata y la declinación de poblaciones de aves silvestres) mostraron la necesidad de conocer los efectos de las sustancias y compuestos químicos una vez presentes en el ambiente. La ecotoxicología, disciplina que estudia justamente el efecto de los contaminantes químicos sobre los ecosistemas, surgió asociada con esa necesidad.

El famoso libro que Rachel Carson escribió en el año 1962, Primavera Silenciosa, sobre la declinación de las poblaciones de aves por efecto de los pesticidas, tuvo un gran impacto sobre la opinión pública; marco la toma de conciencia sobre el efecto que las actividades humanas podían causar sobre la vida silvestre y sobre la necesidad de tomar acciones para protegerla. Por otra parte, existen autores que asocian la difusión que alcanzó el libro de Rachel Carson con el surgimiento de una nueva rama del derecho, el derecho ambiental. Es una rama del derecho joven en comparación con otras, es muy extensa, y abarca muchos aspectos, por ejemplo, la regulación de los compuestos químicos tóxicos, los recursos naturales o la protección de especies en peligro de extinción. A partir de la conferencia de Naciones Unidas sobre Ambiente Humano que tuvo lugar en Estocolmo en el año 1972 se crearon, en muchos países, ministerios y secretarías de ambiente, y se promulgaron leyes ambientales. Se consolidaron, a partir de esa fecha, programas de investigación, educación y regulación relacionados específicamente con la presencia de sustancias químicas en el ambiente.

A partir de los años 60, se comenzó a controlar mediante legislación específica la liberación de sustancias tóxicas al ambiente, tanto desde los efluentes líquidos y gaseosos como aquellos de aplicación deliberada (por ejemplo, los pesticidas).

Hacia 1980 apareció otro problema en relación con las sustancias tóxicas, el cual requería un enfoque diferente y más complejo para su regulación. En los tejidos de animales que vivían en las regiones árticas (osos polares, focas) se encontraron compuestos como pesticidas clorados y bifenilos policlorados, pese a que los mismos no se utilizaban en esas regiones. Se comprobó que estos contaminantes se podían transportar a través de la atmósfera hacia regiones muy alejadas del sitio de emisión. Estos compuestos se denominan Compuestos Orgánicos Persistentes (COPs), son muy resistentes a la degradación, muy bioacumulables y tóxicos.

En el año 2004 entró en vigencia el Convenio de Estocolmo, al cual adhirieron la mayoría de los países, que prohibió el uso de compuestos orgánicos persistentes (COPs). La Argentina adhirió al Convenio de Estocolmo a través de la ley 26.011 del año 2004. El caso del mercurio es similar al de los COPs, en el sentido que es persistente, puede transportarse a largas distancias, se bioacumula, biomagnifica y además es muy tóxico para el ser humano. El Convenio de Minamata, firmado recientemente por muchos países, tiene como objetivo proteger la salud humana y el ambiente de las emisiones y liberaciones por actividades humanas del mercurio y sus compuestos (PNUMA, 2014).

2.1.2 Las profecías de Purchase

Es interesante que en el VIII Congreso de la International Union of Toxicology (IUTOX), celebrado en París en las postrimerías del siglo XX (1998), su presidente el Dr. Ian F.H. Purchase, advertía en la conferencia inaugural, que en los años por venir los toxicólogos serían testigos de algunos eventos tales como: rápidos avances científicos, aumento en la demanda de evaluación de riesgo ambiental de la biotecnología, crecimiento de la preocupación pública por los riesgos asociados a las sustancias químicas y a las técnicas de ingeniería genética, y que la evaluación de riesgo ambiental y sanitario sería reclamada internacionalmente. Para el ámbito de la toxicología en particular anticipaba que se esperaban transformaciones tecnológicas gracias a los avances en la Genómica y la Biología Molecular y que la interpretación mecanística de la toxicidad sería la norma.

Con el transcurso del tiempo desde entonces, se han añadido a esas listas las consecuencias de los cambios en las técnicas de producción agrícola y de los fenómenos de urbanización que afectaron significativamente el perfil ecotoxicológico de los ecosistemas periféricos intervenidos, agrícolas y urbanos. En este marco, la atención de algunos ecotoxicólogos acuáticos se está orientando al estudio de entidades químicas genéricamente rotuladas como “contaminantes emergentes”, caracterizados por su enorme diversidad química, así como por la variedad de sus impactos ambientales sobre la biota de cada ambiente, incorporadas a los medios por la actividad humana.

Confirmando algunos de los anticipos de Purchase, los métodos disponibles para evaluar los impactos de los tóxicos están ganando en precisión y predictibilidad gracias a los avances que aportan variados desarrollos tecnológicos que abrieron las puertas para diseñar e incorporar nuevas técnicas, de mayor capacidad, sensibilidad y precisión hasta niveles suborganismo y subcelular, así como a nuevos conocimientos complementarios aportados desde numerosas relaciones transversales entre diferentes ramas de la ciencia básica (por ejemplo, evaluación de los efectos epigenéticos - o diferidos de las diferentes categorías de tóxicos).

Sin embargo, hemos de reconocer que a nivel de individuos carecemos aún de antecedentes suficientes y firmes que permitan entender cabalmente el modo en que los cambios adversos subletales que se registran en las variables celulares o tisulares pueden ser extrapolados a niveles de organización biológica mayores (por ejemplo, organismo o población). Resolver esta limitación

de la ecotoxicología no se presenta como tarea sencilla, pero si crítica para abordar evaluaciones de riesgos ambientales con mayor precisión (Salibián, 2015)

2.2 Enfoques y criterios aplicados para el saneamiento de cuencas hídricas

Las cuencas hídricas del Gran Buenos Aires, han sido y continúan severamente intervenidas por las descargas de grandes cantidades de desechos domiciliarios e industriales legales e ilegales. Siendo los proyectos de saneamiento casi tan antiguos como nuestra patria. Incluyendo uno asociado con un fallo, donde en el año 2008, la Corte Suprema de Justicia de la Nación (CSJN) intimó a la Autoridad de Cuenca Matanza Riachuelo (ACUMAR) a implementar un plan de saneamiento en respuesta a la causa judicial conocida como “Mendoza Beatriz y otros”, reclamo presentado en 2004 por un grupo de vecinos. Ante estos resultados, cabe preguntarse si no es oportuno perfeccionar el enfoque y los criterios aplicados.

Básicamente, hay dos componentes que afectan severamente la calidad de las aguas: el microbiológico, por los gérmenes patógenos asociados con los desechos domiciliarios entre otros; y la toxicidad aportada por efluentes industriales, drenaje de agroquímicos, desechos domiciliarios, lixiviados de rellenos sanitarios y otros pasivos ambientales como basurales a cielo abierto, depósitos de desechos tóxicos, y hasta las aguas pluviales que arrastran diferentes sustancias hacia los cuerpos receptores (Herkovits, J., 2015).

Hay un gran número de documentos oficiales o encargados por organismos oficiales como la Autoridad de Cuenca Matanza Riachuelo (ACUMAR), el Comité de Cuenca del Río Reconquista (COMIREC) o el recientemente creado Comité de Cuenca del Río Luján (COMILU); que tratan parte de la problemática de las cuencas hídricas en el Gran Buenos Aires. Si bien con diferente énfasis, en general, los temas sobre la población y sus características (eventualmente salud) número y características de los establecimientos industriales, situación económica, geología, caudal e inundaciones, flora y fauna, aspectos fisicoquímicos y bacteriológicos, son habitualmente tratados en estos documentos, eventualmente asociados con proyectos de saneamiento.

Los estudios ecotoxicológicos permiten caracterizar efectos adversos producidos tanto por sustancias simples, como por mezclas complejas, tal como se presentan, por ejemplo, en cuencas hídricas impactadas por la actividad antropogénica.

Las cuencas hídricas se han transformado en sumideros de la contaminación y en el caso del Gran Buenos Aires, han sido intervenidas de múltiples formas por una población que actualmente, es de unos 13.000.000 de personas (INDEC, 2010). Para las principales cuencas, como, por ejemplo; la del río Reconquista y la del río Matanza-Riachuelo, se han realizado numerosos estudios a cargo de organismos oficiales, por su encargo o financiados por organismos de ciencia y tecnología que, eventualmente, fueron asociados a proyectos de saneamiento ejecutados o en ejecución. Siendo la toxicidad uno de los parámetros que afecta en forma más dramática la calidad de las aguas, la incorporación de criterios ecotoxicológicos permitiría perfeccionar la comprensión del problema, caracterizar su magnitud, como así también, definir y monitorear objetivos de saneamiento, para lograr que estos ecosistemas recuperen la vida.

Las cuencas hidrológicas son sumamente importante no solo por que permite el desarrollo de actividades industriales sino también por que brinda beneficios directos e indirectos a la región. Los distintos ecosistemas de la cuenca cumplen funciones ecológicas, como ser la regulación del ciclo hidrológico, y de los ciclos biogeoquímicos, ser refugio de biodiversidad, ayudar a la depuración de aguas, y sus atributos paisajísticos posibilitan en muchos contextos geográficos actividades culturales, turísticas, recreacionales y residenciales. A este tipo de aprovechamientos para la sociedad se los denomina servicios ecológicos, y son los que proporcionan, en gran medida, el sustento de la sociedad humana y la economía mundial.

2.3 La ecotoxicología como herramienta de diagnóstico y monitoreo para cuencas hídricas

Ante situaciones de contaminación ambiental, la principal pregunta es: ¿En qué medida implica efectos adversos sobre el ecosistema y la salud humana? Desde la antigüedad se han utilizado organismos centinela que, por su sensibilidad frente a ciertos tóxicos, alertan sobre situaciones de peligro.

Es ampliamente aceptado que existe una relación directa entre la calidad ambiental y la salud humana. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2018), más del 60% de las enfermedades son de origen ambiental, incluyendo cáncer, teratogénesis, infecciones, hipertensión, alergias, neuropatías, etc. Por otra parte, el ecosistema brinda beneficios múltiples y de enorme valor económico, por ejemplo, la capacidad de autodepuración de tóxicos, generación del oxígeno para la respiración, recreación, valor estético e inmobiliario (Herkovits, J., 2015).

La ecotoxicología incluye métodos multidisciplinarios cuyo objetivo es evaluar el eventual efecto adverso de agentes fisicoquímicos aislados o en combinación, sobre organismos vivos. También permite identificar el origen de la toxicidad en mezclas complejas y realizar el análisis de riesgo, herramienta fundamental para la toma de decisiones.

Ahora, como en todo diagnóstico, es fundamental utilizar los métodos apropiados para cada propósito, ya que en caso contrario, se reportaran informes de escasa relevancia en relación con el objetivo, falsos negativos o falsos positivos, alejando así, las decisiones de los objetivos declarados, el saneamiento, y el posterior cuidado de la calidad de las aguas para que sean aptas para la vida.

Dada la magnitud del tema y del número de implicados, para poder incorporar criterios ecotoxicológicos, es fundamental contar con métodos simples, rápidos, económicos, confiables y aceptados internacionalmente, que permitan una tarea sostenida en el tiempo, y así, lograr limitar la toxicidad a valores compatibles con la vida en el menor tiempo y al menor costo posible. Cabe destacar, que la toxicidad incompatible con la vida no es un valor que se pueda fijar arbitrariamente en base a negociaciones, lo que garantiza transparencia y comprensión de todos los involucrados en la problemática.

Sobre la base de ejemplos de trabajos realizados durante las últimas décadas, por distintos autores se puede focalizar desde la ecotoxicología, concluyendo que, aplicados con rigurosidad, aún los más básicos, aquellos que son fáciles de comprender y utilizar, permitirían una gestión sustentable en las cuencas que registran una toxicidad de hasta veinte veces por encima del máximo permitido según la EPA (Agencia de Protección Ambiental), para efluentes industriales (Herkovits, J., 2015).

De todos estos, surgen dos conclusiones; en primer lugar, permite comprender que los estudios ecotoxicológicos son irremplazables y segundo, que una metodología simple puede ser suficiente para objetivos de diagnóstico y monitoreo, para alcanzar objetivos de calidad de agua compatible con la vida.

CAPÍTULO 3:

ORGANISMOS MODELOS COMO BIOINDICADORES

3.1 ¿Qué es un organismo modelo?

Un organismo modelo se refiere a aquellas especies que han sido intensamente estudiadas y que se usan para investigar múltiples aspectos de la biología; es decir, un organismo es modelo si está siendo usado como un análogo o que es ilustrativo para algo que por sí mismo no está bajo estudio directo, como la totalidad de un grupo de animales o un ancestro extinguido irreparablemente.

Cualquier animal seleccionado para un estudio es un modelo si es tomado como representante de algunas características de un grupo mayor (género, familia, orden o phylum) o de un taxón inaccesible. Una característica de un organismo modelo es general para el grupo filogenético si es compartida por los otros miembros del grupo, cuya similitud se debe a que comparten un ancestro común, una evolución convergente o incluso una función similar (Lozada García, Sanchez Palmeros, Ramirez Benitez, & Fernandez, 2012).

Dentro de las especies modelo más estudiadas se encuentran ciertas bacterias entéricas, la levadura de cerveza, el moho, algunos nemátodos y gasterópodos, la mosca de la fruta, ciertos anfibios; ranas y axolotes, el pollo, el ratón, y recientemente la planta herbácea conocida como *arabidopsis* u oruga y el pez cebra.

El uso de estos pocos organismos modelo ha permitido disponer de recursos importantes para el desarrollo de una serie de herramientas, como la secuencia de prácticamente todo su genoma y de pruebas moleculares, tablas de desarrollo, protocolos estandarizados de biología molecular e histología, métodos de manipulación genética y de embriones y líneas especializadas de varios tipos, incluyendo cepas de híbridos y líneas genéticas, todo lo cual ha hecho posible el gran avance de la biología.

Estos organismos son para el investigador el equivalente a un reactivo biológico, por lo que debe controlarse su pureza y evitar su contaminación biótica, por lo que se requiere que su producción sea estandarizada, que tengan características genéticas y sanitarias definidas, que sean criados o cultivados en ambientes controlados que respeten los requerimientos de la especie y que se cumplan los principios éticos para su bienestar.

3.2 Modelo biológico vertebrado I; Anfibio (*rhinella arenarum*)

3.2.1 Situación de los anfibios

Los anfibios se consideran derivados de los *Crossopterigios* durante la Era Paleozoica y más precisamente en el período Devónico (inicialmente aparecieron los *Stegocephalia*). Hablando en términos de evolución, representan los primeros vertebrados adaptados, aunque no de manera exclusiva, el hábitat terrestre. Continúan en efecto relacionándose con el ambiente acuático en mayor o menor grado, según la especie, para satisfacer no solo las exigencias fisiológicas relacionadas con el intercambio hídrico y gaseoso, sino también para poder realizar los procesos inherentes a la propagación de la especie.

Salvo algunas excepciones, reproducción y desarrollo tanto embrionario como larval, se cumple para los anfibios en el agua (Pisano, 1977).

Desde 1969 se viene informando una disminución alarmante de las poblaciones de anfibios en tamaño y número de individuos a nivel global (Relyea, Schoepner, & Horveman, 2005). En este sentido, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2019) reconoce 6 categorías según el estado de conservación de los anfibios basado en antecedentes científico-técnicos, del que se desprende que el 36,5 % de las especies se encuentran bajo algún grado de amenaza (ver Fig.15).

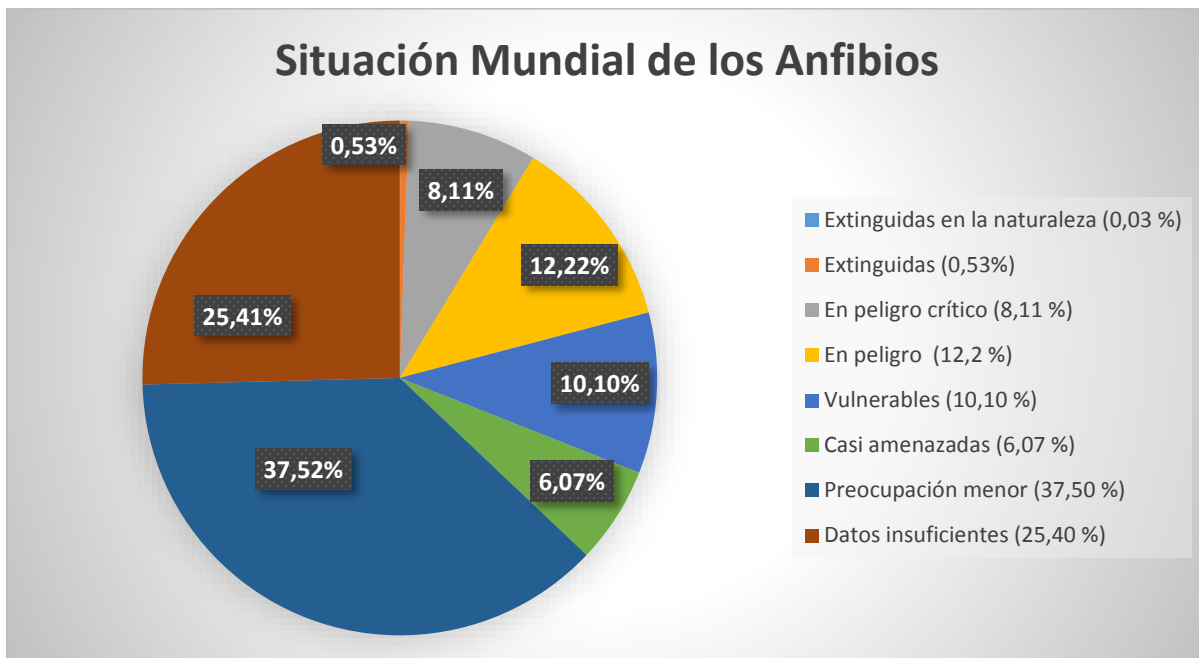


FIGURA 15- CATEGORIZACIÓN DEL ESTADO DE CONSERVACIÓN DE LAS ESPECIES DE ANFIBIOS EN EL MUNDO FUENTE: IUCN 2013

Existen diversos factores sobre esta disminución que, según (Collins & Storfer, 2003), pueden ser clasificados en dos grupos. El primero incluye factores generales críticos para la biodiversidad como destrucción, modificación y fragmentación del hábitat, competencia o predación por especies introducidas y sobreexplotación. Sin embargo, las poblaciones de anfibios han sufrido declives en ambientes naturales remotos sin perturbaciones aparentes. El segundo grupo incluye factores más complejos como el cambio climático, el incremento en la radiación UV-B, los contaminantes químicos como plaguicidas, fertilizantes y metales pesados, enfermedades infecciosas y malformaciones (Lajmanovich, 2015). Según la IUCN, el factor de riesgo más importante para los anfibios es la actividad agrícola y la acuicultura. Los mecanismos subyacentes a estos factores son complejos y pueden estar interactuando sinérgicamente con los factores del primer grupo exacerbando la caída en los números poblacionales.

Los anfibios ocupan un lugar estratégico en las tramas tróficas, con formas acuáticas y terrestres, y debido a su alta susceptibilidad, resultan muy buenos indicadores del estado de salud del ambiente (Hartwell, Welsh, & Ollivier, 1998). La piel de los adultos, los epitelios de revestimiento de las larvas y las membranas de los huevos son altamente permeables a los contaminantes (Herkovits & Perez-Coll, 1999). En general, los anfibios constituyen un taxón particularmente afectado por la aplicación de muchos plaguicidas en los campos agrícolas, ya que éstos se acumulan en charcas temporales y resultan en altas concentraciones durante la primavera y el verano, coincidiendo con la época reproductiva y las etapas altamente susceptibles del ciclo de vida de estos organismos.

3.2.2 El modelo biológico: *rhinella arenarum* (Sapo americano)



FIGURA 16- EJEMPLAR ADULTO DE *RHINELLA ARENARUM* (SAPO COMÚN AMERICANO)

Clasificación taxonómica de la especie según Hensel, 1867

Phyllum: *chordata*

Clase: *amphibia*

Subclase: *lissamphibia*

Orden: *anura*

Familia: *bufonidae*

Género: *rhinella*

Especie: *rhinella arenarum*

Rhinella (Bufo) arenarum, vulgarmente conocido como sapo común sudamericano (*ver Fig. 16*), es una especie de anfibio anuro que se distribuye ampliamente en Sudamérica. Mide aproximadamente unos 15 cm de longitud hocicocloaca, presentando el dorso de color marrón verdoso con verrugas y el vientre de color claro. Debido a que su piel es altamente permeable, suelen ser más susceptibles a los contaminantes en el medio ambiente que otros organismos como las aves o los mamíferos. En invierno se ocultan en refugios naturales o bajo tierra. Los grandes cuerpos grasos son utilizados para cubrir sus limitadas necesidades metabólicas durante la hibernación. Se alimentan de insectos, lombrices y crustáceos terrestres. En concordancia con un ciclo sexual potencialmente continuo, la reproducción y puesta se extienden durante gran parte del año, pero mayoritariamente ocurre durante la primavera y principios del verano, lo cual coincide con la estación de lluvias. En el proceso reproductivo de esta especie (*ver Fig. 17*), las hembras son atraídas por la voz de los machos. El amplexo o abrazo se realiza en el agua. Éstas expulsan sus huevos por el estímulo que ejerce el macho durante el amplexo. Los huevos, pequeños y oscuros, son expulsados en cordones gelatinosos mientras son fecundados externamente por los machos. Un promedio de 4000-5000 huevos es frecuente para la puesta de una hembra madura en una temporada reproductiva (Herkovits & Perez-Coll, 1999).

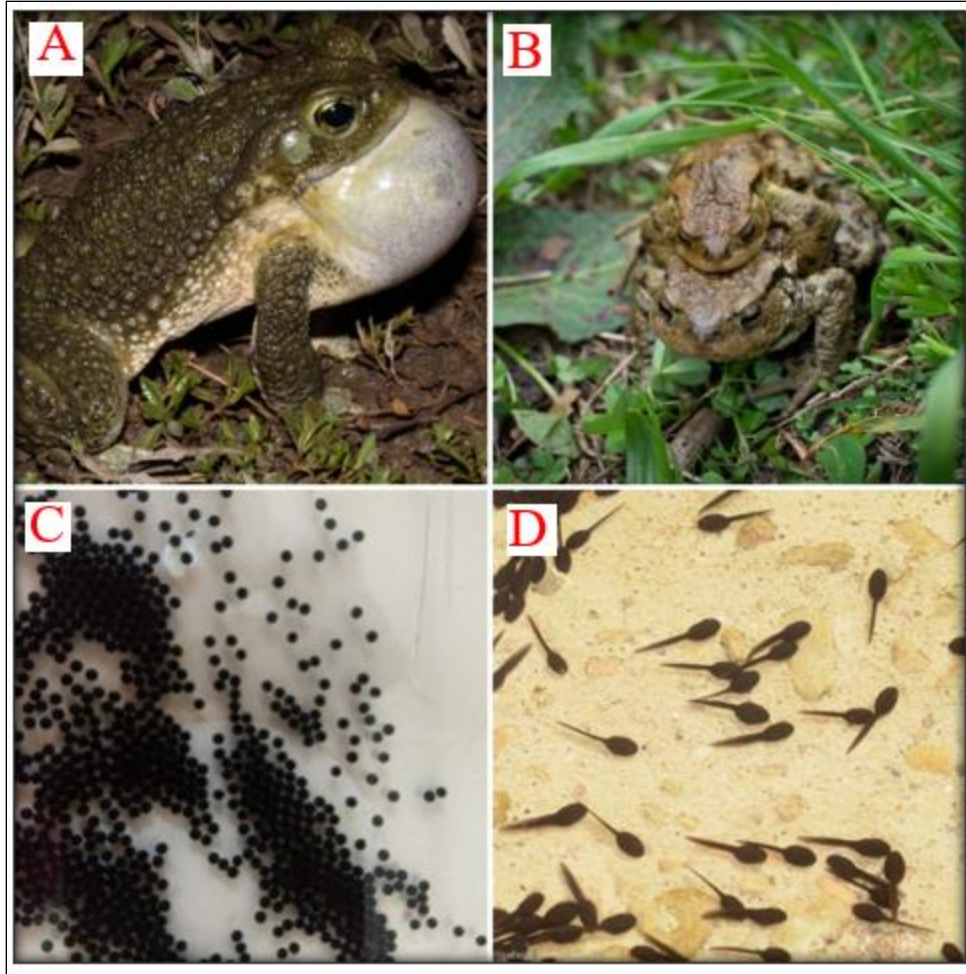


FIGURA 17- REPRODUCCIÓN *RHINELLA ARENARUM*: (A) LLAMADA DE APAREAMIENTO DEL EJEMPLAR MACHO; (B) AMPLEXO; (C) RISTRA DE HUEVOS FECUNDADOS; (D) LARVAS DE VIDA LIBRE (RENACUAJOS). FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

La especie *rhinella arenarum* posee huevos de características heterolecíticas ya que el vitelo se acumula en mayor cantidad en el polo inferior (polo vegetativo), si bien queda mezclado todavía con citoplasma. Condición inversa se encuentra en el polo animal, en el que se ubica una mayor cantidad de citoplasma mezclado con escasa cantidad de vitelo. Durante la fecundación se produce la rotación cortical formando la “media luna gris. El desarrollo embrionario comienza con la primera división mitótica del oocito recientemente fecundado dando lugar a dos blastómeros. Al inicio de la segmentación se producen dos divisiones meridionales iguales. Luego ocurre la primera división ecuatorial, desplazada hacia el polo animal, por lo que se produce una desigualdad en el tamaño de los blastómeros de los polos (segmentación holoblástica desigual), formando micrómeros y macrómeros. Los micrómeros, células más ricas en citoplasma, se dividen con un

ritmo bastante más acelerado que las del polo vegetativo, macrómeros, abundantes en vitelo (Pisanó, 1977).

En los primeros estadios (E) del desarrollo en *rhinella arenarum* desde la fecundación del oocito E1 hasta la finalización del desarrollo embrionario E25 coincidente con el inicio de la etapa larval, representada por un organismo de vida libre con branquias internas que comienza a alimentarse (Del Conte & Sirlin, 1951).

El embrión de dos blastómeros E3 continúa experimentando divisiones mitóticas, sin aumento en el tamaño ni cambios en su forma esférica, pasando por diferentes estadios en los que predomina la división celular. Este proceso es conocido como segmentación E3 a E9. La blástula que se forma como consecuencia de la segmentación es una blástula con un verdadero blastocele (celoblástula), cuya pared tiene por lo menos dos capas de células, siendo considerablemente mayores las del polo vegetativo. Estas células impiden una invaginación completa durante la gastrulación.

Entre los E10 y E12 transcurre la gastrulación, proceso en el cual es muy importante el desplazamiento de células hacia el interior del embrión, quedando determinado un organismo triblástico (endodermo, mesodermo y ectodermo), con tres capas de células a partir de las cuales se formarán los futuros órganos y tejidos. La gastrulación comienza gracias a la invaginación, un movimiento de rotación interna que involucra al endodermo y mesodermo, conocido como rotación vegetativa. La involución de células emigrantes formará el labio dorsal del blastoporo. Mientras que continúan dichos movimientos de invaginación e involución, la epibolia de las células del anillo germinal acabará aislando a las células del vitelo dentro de los límites del blastoporo, en un área que se conoce como tapón vitelino (Scott, 2005).

Posteriormente ocurre la neurulación E13-E16 que culmina con la formación del tubo neural, el incipiente sistema nervioso del embrión. Conjuntamente con la neurulación, el embrión va adquiriendo simetría bilateral y va elongándose.

A partir del E17, los embriones eclosionan espontáneamente de la membrana vitelina y de la gelatina y posteriormente adquieren movimientos expresados mediante contracciones musculares E18.

A partir del E18 su cuerpo comienza a alargarse, se diferencia más netamente el cuerpo de la cola y van transformándose en embriones-larvas de vida libre.

El funcionamiento del sistema cardiovascular se pone de manifiesto al observarse el latido cardíaco en el E19 y la circulación de la sangre se observa por primera vez en las branquias E20. Posteriormente se abre la boca E21, si bien todavía no se alimenta a partir de nutrientes del medio externo, sino que utilizan sus reservas internas (plaquetas vitelinas).

En el E22, la circulación ya puede observarse en la aleta y a partir del E23 y hasta el E25 se va formando la cámara opercular, por lo que las branquias pasan a ser internas.

Al alcanzar el E25, las larvas miden aproximadamente 10 mm de longitud, son de cuerpo claviforme y coloración negruzca. A partir de esta etapa del desarrollo, las larvas buscan activamente su alimento, aumentan de tamaño y culmina su desarrollo, luego de transitar por los distintos estadios larvales hasta completar la metamorfosis, transformándose en pequeños juveniles, semejantes a los adultos pero sin madurez sexual. La duración del desarrollo varía con las condiciones de temperatura y fotoperíodo, siendo más corto al aumentar las dos variables. El desarrollo embrionario temprano desde la formación de los 2 blastómeros hasta el desarrollo de una larva de vida libre con branquias internas E25, a 18-20°C puede tardar aproximadamente de 7 a 10 días. A partir de este momento comienza el desarrollo larval, el cual, es más variable dependiendo de las condiciones externas como disponibilidad de alimento y luz, pudiendo demorar un par de meses. El periodo larval se extiende desde la aparición del esbozo de los miembros posteriores hasta la desaparición completa de la cola. Durante la pre-metamorfosis, los organismos buscan activamente su alimento y aumentan de tamaño a la vez que se desarrollan los miembros posteriores. El clímax metamórfico se caracteriza por la emergencia y el desarrollo de los miembros anteriores y la reabsorción de la cola (Echeverría & Fiorito de Lopez, 1981)(*ver Fig. 18*).

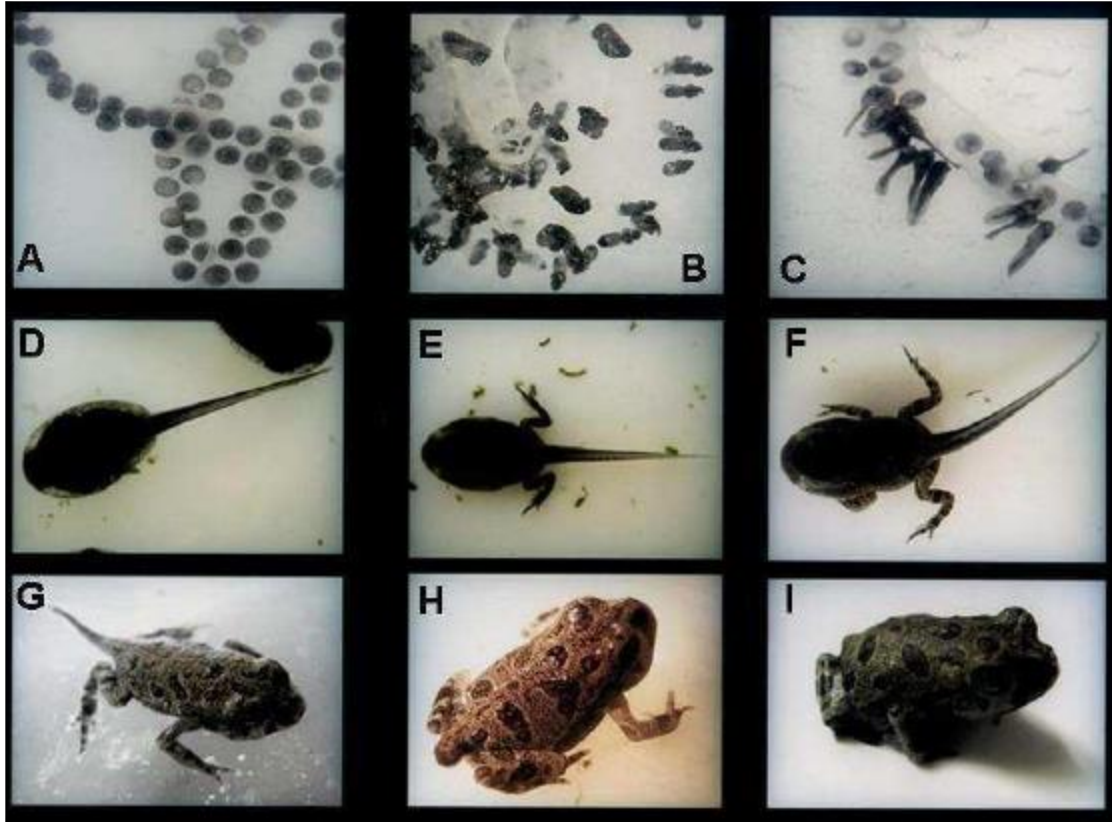


FIGURA 18- DESARROLLO *RHINELLA ARENARUM* (A) HUEVOS; (B) EMBRIONES DENTRO DE LA RISTRA GELATINOSA; (C) EMBRIONES RECIÉN ECLOSIONADOS QUE PERMANECEN FIJADOS A LA RISTRA; (D) LARVA PRE-METAMÓRFICA; (E) LARVA PRO-METAMÓRFICA, MIEMBROS POSTERIORES EN DESARROLLO; (F) LARVA METAMÓRFICA, MIEMBROS ANTERIORES EN DESARROLLO; (G) LARVA METAMÓRFICA, COLA REABSORBIÉNDOSE; (H) JUVENILES RECIÉN METAMORFOSEADOS. FUENTE: (SVARTZ, 2014)

Estos anfibios poseen una amplia distribución, tanto en ambientes húmedos como áridos siempre que exista un cuerpo de agua cercano. En Argentina, se encuentran desde el norte de la provincia de Jujuy hasta el río Chubut, cerca de la costa patagónica, hacia el oeste alcanzan la frontera sur del Neuquén, cerca del río Limay (*ver Fig. 19*). También se encuentran en el sur de Brasil, en Uruguay y Bolivia. Habitan preferentemente ambientes de bosques bajos, estepas y pastizales. Esta especie está adaptada no sólo a la vida en distintas condiciones térmicas sino también a distintas situaciones de humedad y altitud. Habita desde regiones de clima tropical a regiones de temperaturas cercanas a 0°C y zonas húmedas de más de 1000 mm anuales de precipitación a zonas secas con menos de 500 mm. En la cordillera alcanza los 1500 m en latitudes como Mendoza y hasta 2400 m en latitudes más al norte como Catamarca o La Rioja.

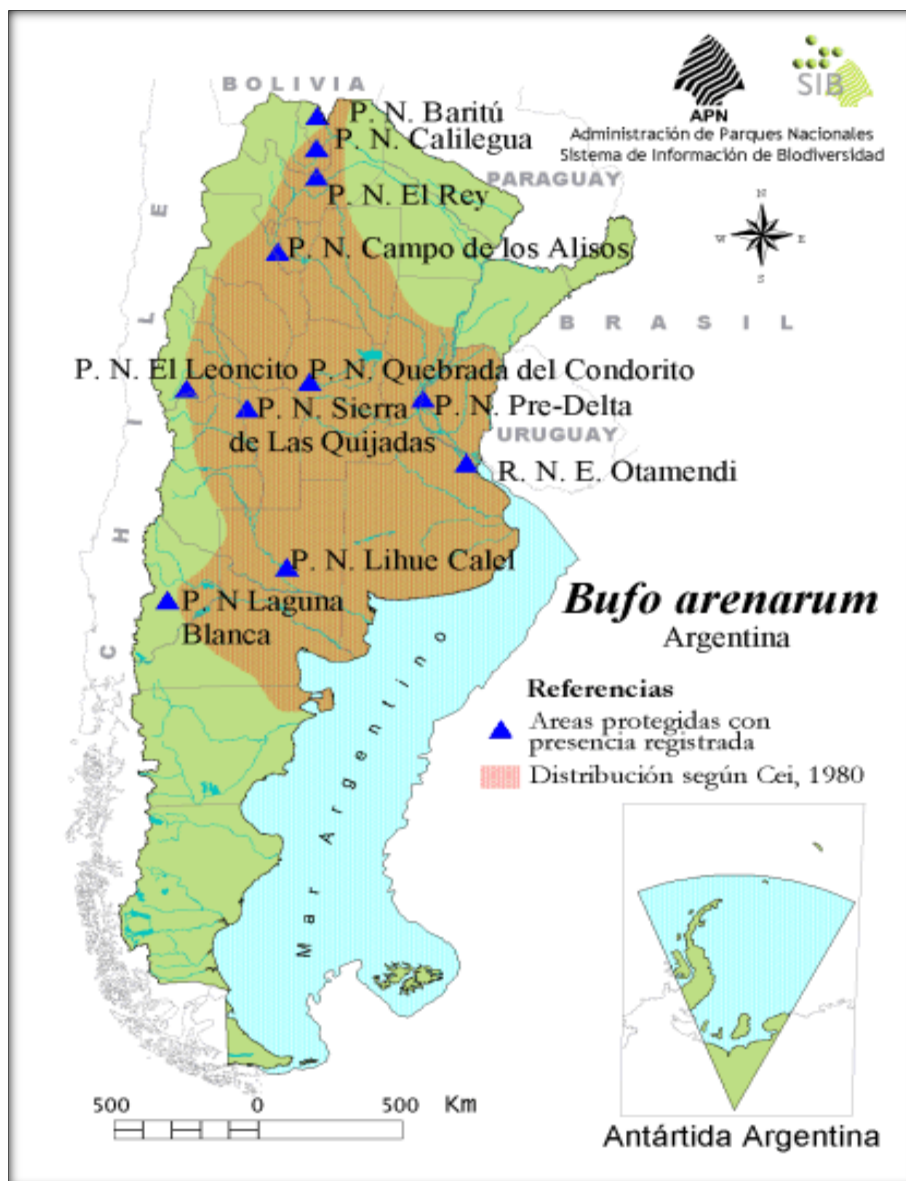


FIGURA 19- DISTRIBUCIÓN DE *RHINELLA ARENARUM* EN ARGENTINA FUENTE: SISTEMA DE INFORMACIÓN DE BIODIVERSIDAD (SIB) DE LA ADMINISTRACIÓN DE PARQUES NACIONALES

3.3 Modelo biológico vertebrado II; Pez (*danio rerio*)

3.3.1 Situación de los peces

Hace unos 19 años, durante la segunda mitad del año 1997 el NIH (National Institutes of Health) comenzó a promover el uso del Pez cebrá (*danio rerio*). Esa promoción fue una respuesta institucional a la recomendación de la comunidad de científicos que quisieron favorecer el uso de *danio rerio* como organismo biológico y modelo para investigaciones científicas (especialmente

las biomédicas). La recomendación para utilizar esta especie en ciencia, se hizo sobre la base de las características biológicas de estos animales (Gali, 2017).

Es una especie cuyos individuos se desarrollan rápido y las camadas son muy numerosas. Esas dos características son las más deseables en un modelo biológico animal. Que el lapso entre generaciones sea breve y los descendientes numerosos posibilita la realización de estudios poblacionales con un elevado número de individuos. También permite que se analicen características genéticas ya que los tiempos necesarios para la manifestación de la herencia entre una y otra generación es breve (Espinoza, 2016).

El pez cebra junto a la rana africana (*xenopus sp*) y los gallos (*gallus sp*) son los modelos de vertebrados no mamíferos más utilizados actualmente en las ciencias biomédicas. Los peces como modelo animal para investigaciones en biomedicina, constituyen una alternativa que se está extendiendo muchísimo.

Este pez normalmente se puede encontrar en ríos de aguas lentas y lagunas de la India, Bangladesh y Pakistán. Esta región geográfica tiene clima monzónico, con temporadas lluviosas y secas pronunciadas que tienen un profundo efecto en los parámetros del hábitat de este pez, así como en la química de los recursos hídricos.

Los ejemplares de esta especie tienen una coloración verde aceitunada o dorada, con tonalidades marrones, y hacia el vientre se intensifica el color blanco; cuatro líneas de color azul, que van desde los opérculos hasta la aleta caudal, recorren los costados longitudinalmente. Los machos tienen un cuerpo delgado y comprimido, con una papila genital muy poco notoria, y son de menor tamaño que las hembras, predominando en ellos la coloración dorada; las hembras exhiben una distintiva papila genital, su forma corporal es más gruesa, tienen el vientre abultado y redondeado y su coloración predominante es el verde aceitunado (*ver Fig.20*).

El pez cebra vive en pequeños bancos que van desde cinco a veinte individuos; se reproducen y desovan de manera asincrónica; sobre el sustrato depositan sus huevos, que no son cuidados por los padres después del desove. Como otros peces de regiones monzónicas, la época de lluvias marca el inicio de la estación de reproducción, aunque se han observado hembras con hueva madura durante la época de sequía, lo que permite suponer que la reproducción está más correlacionada con la disponibilidad de alimento, que se ve intensificada con las lluvias. La fecundación es externa y los huevos, dependiendo de las condiciones ambientales, liberan larvas

que nadan libremente después de cuatro a siete días de ser fecundados. Los machos son territoriales sobre los posibles sitios de desove y adoptan tácticas para perseguir a las hembras. De su ciclo de vida solo se tienen datos de laboratorio, donde llegan a vivir hasta cinco años (Lozada García, Sanchez Palmeros, Ramirez Benitez, & Fernandez, 2012).

Respecto a su dieta, estos peces son generalistas, es decir, consumen una amplia variedad de crustáceos del fondo marino, además de gusanos y larvas de insectos, si bien muestran una marcada preferencia por las larvas de los dípteros, por lo que se ha propuesto su uso para el control de mosquitos.

Es un modelo animal también elegido en educación, *danio rerio* se ha incorporado a la escena de la ciencia hace poco tiempo y la historia del uso de pez cebra como herramienta educativa es breve. Los docentes en todo el mundo están desarrollando actividades interesantes utilizando estos peces en los cursos. Los debates, reuniones y talleres sobre el “Pez Cebra en el Aula” se hacen desde el año 2008. Hay un consenso internacional a favor de la incorporación del pez cebra para la educación con la idea de que tendrá un impacto importante (Espinoza, 2016).

Las experiencias directas son muy valiosas y necesarias para ayudar a cambiar la forma en que entendemos el mundo. Impulsar el uso de este modelo incluso para enseñar el cuidado que se debe tener para con el medio ambiente, podría causar consecuencias muy beneficiosas.

Por ejemplo, se pueden realizar experimentos simples para mostrar los efectos nocivos para la salud de las sustancias químicas contaminantes. Mediante el empleo de estos peces y un acuario sencillo, se pueden enseñar una variedad de temas.

3.3.2 El modelo biológico: *danio rerio* (Pez cebra)

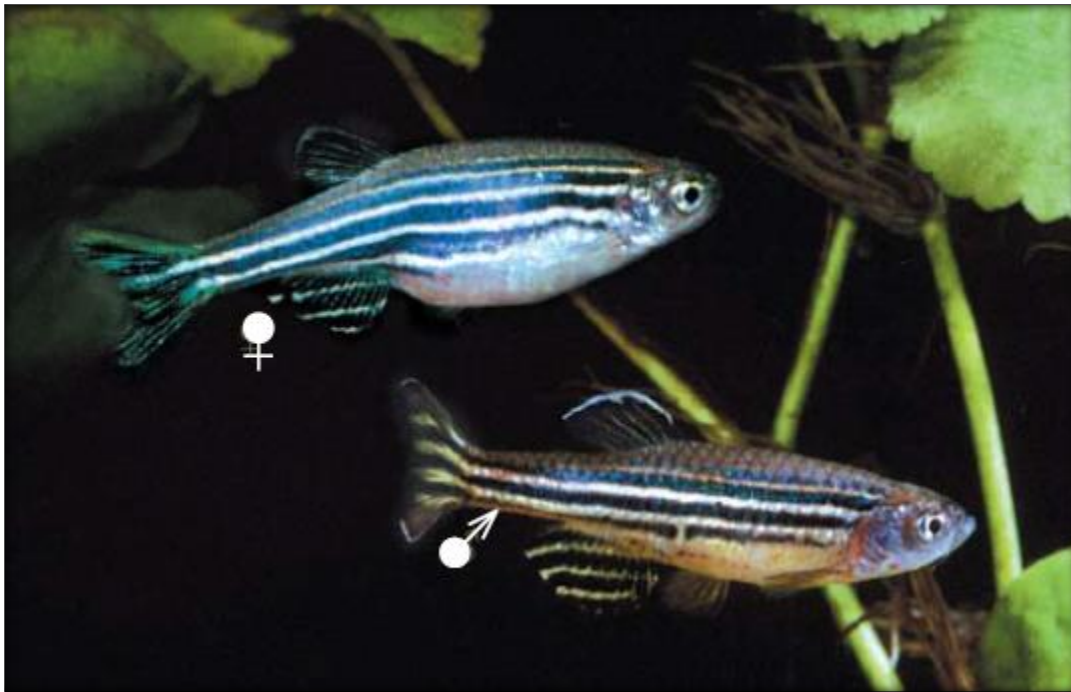


FIGURA 20- EJEMPLAR HEMBRA Y MACHO DE *DANIO RERIO* EN LABORATORIO.

Clasificación taxonómica de la especie según Halminton, 1822

Reino: animal

Phylum: *cordados (chordata)* - *subphylum: vertebrata*

Clase: *sctinopterygii* (peces óseos)

Orden: *cypriniformes*

Familia: *cyprinidae*

Danio rerio (pez cebra), es nativo del sureste asiático y su rango de distribución natural incluye las cuencas del Ganges y el Brahmaputra y las aguas dulces tropicales de las regiones monzónicas de la India, Bangladesh, Nepal, Pakistán, Bután, Tailandia y el norte de Myanmar. Viven próximo a las orillas de aguas lentas y estancadas con vegetación acuática abundante de ríos, estanques, arrozales, etc. en Ceilán, India, Pakistán, Bangladesh y Birmania. (Ver Fig. 21).



FIGURA 21- HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN DE PEZ *DANIO RERIO*. FUENTE: (VIVE LA NATURALEZA, 2020)

Es una especie gregaria que forma pequeños bancos. La reproducción es ovípara y se reúnen en grupos para aparearse. El macho nada en círculos exhibiendo sus aletas para atraer a la hembra. La fecundación es externa; la hembra pone un centenar de huevos transparentes y el macho los fecunda liberando su espermia mientras nada a su lado. Alcanza la madurez sexual entre los 3 y los 6 meses. Esta especie muy usada en ensayos de laboratorio debido a la similitud entre su genoma y el humano y a su capacidad para regenerar los tejidos durante su etapa larval.

Puede vivir en acuarios pequeños, de unos 20 litros, en grupos de unos 10 ejemplares, pero prefiere acuarios largos, al menos de 60 cm, con buena iluminación, abundante vegetación y espacio libre donde nadar y que podrán compartir con otras especies. La temperatura oscilará entre los 18° C y los 25° C, mejor si fluctúa entre 3° C o 4° C. No son muy exigentes en cuanto al pH y la dureza del agua, pero en condiciones óptimas oscilará entre pH 7,5-7,8 y DH° 15-20.

Su reproducción es muy sencilla (*ver Fig.22*). Se prepara un acuario de 20 litros con fondo de arena y 2 o 3 cm. de bolas de vidrio que protegerán la puesta tras el desove, donde se introducen entre 10 y 15 ejemplares, mejor el doble de machos que de hembras. Parece que la presencia de vegetación acuática, tanto natural como artificial, estimula la reproducción, así como un fondo inclinado que simule la orilla de un río, aunque no son necesarios. La reproducción suele producirse al amanecer. Los alevines se alimentan con infusorios y artemia salina (Lozada García, Sanchez Palmeros, Ramirez Benitez, & Fernandez, 2012).

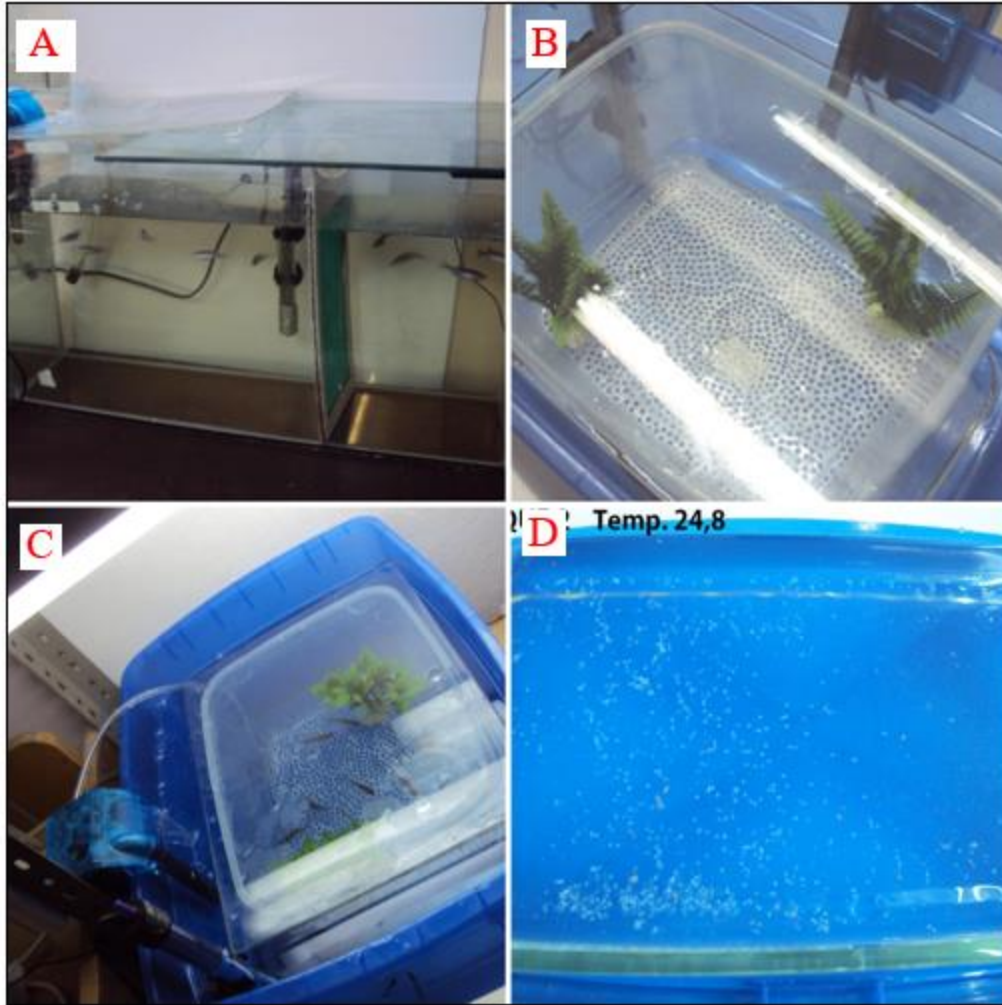


FIGURA 22- PROCESO DE DESOVE (A) SEPARACIÓN DE HEMBRA Y MACHA CON REGULACIÓN DE TEMPERATURA; (B) PREPARACIÓN DEL ESTANQUE PARA INCORPORACIÓN DE ALGUNOS EJEMPLARES; (C) PROCESO DE APAREAMIENTO; (D) DESOVE FUENTE-FUNDACIÓN PROSAMA.

Además de ser uno de los peces más estudiados, entre las ventajas del pez cebra están su potencial reproductivo de entre 100 y 200 huevos por hembra ($500\text{-}600\ \mu$ de diámetro por huevo), su fecundación y desarrollo externos que en 2 días da lugar a un nuevo pez, sus embriones transparentes, su pequeño tamaño (4-5 cm) que permite mantener 25 peces en unos 45 L de agua y su corto tiempo de madurez sexual (unos 5-6 meses).

Es trabajoso conseguir niveles reproducibles de producción de huevos cuando se utilizan pequeñas poblaciones (aproximadamente 20 peces cebras) de reproductores comparado con instalaciones de miles de peces.

Ello es debido al nivel de estrés que les suponen a los peces los métodos más utilizados para su reproducción a pequeña escala: mantener machos y hembras separados, capturarlos cada vez, mantenerlos por las noches en pequeñas parideras (un macho y 2-3 hembras), volver a separarlos y volver a comenzar el ciclo (Rocha, Ruiz, & Coll, 2002). La cantidad de contaminación (heces, partículas, etc.) que se acumula tanto en las parideras como en los acuarios en los que estas se colocan hace difícil la descontaminación de los embriones, lo que provoca altas mortalidades mayormente debidas a hongos. Por otra parte, una vez desinfectados, la manipulación de los embriones y el seguimiento de su evolución, es difícil de cuantificar cuando estos se mantienen juntos. Todo ello lleva aparejado una considerable inversión en tiempo y personal.

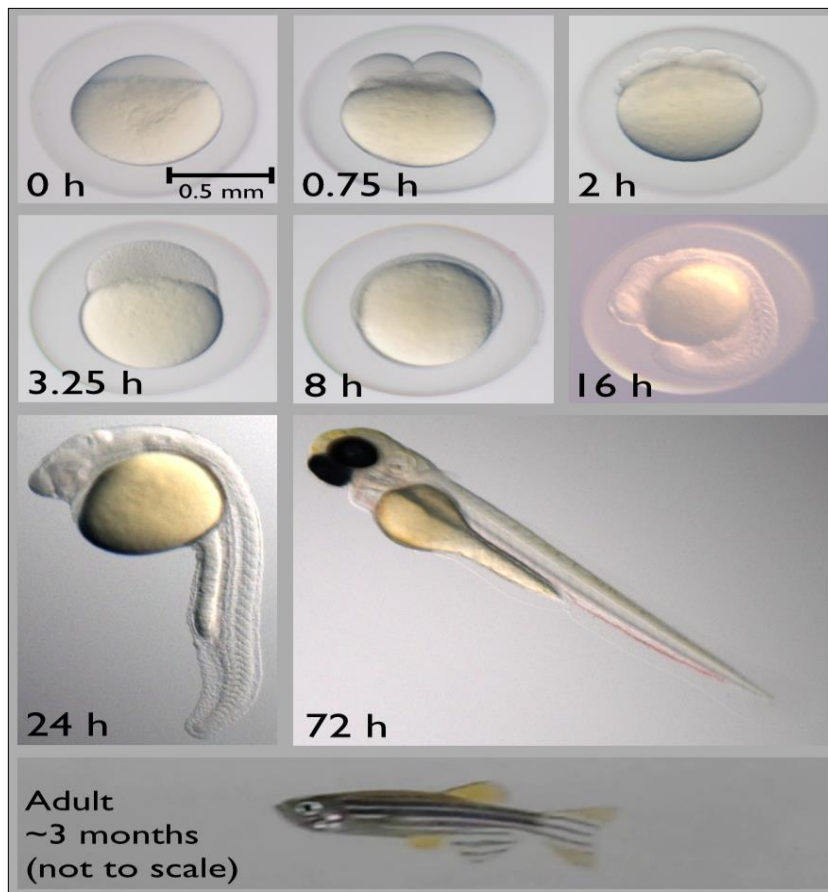


FIGURA 23- ESTADIOS DEL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PEZ *DANIO RERIO*

CAPÍTULO 4:

ESTACIONES DE MONITOREO,
ZONIFICACIÓN, EXTRACCIÓN DE
MUESTRA Y PARÁMETROS
FISICOQUÍMICOS

4.1 Estaciones de monitoreo

Los criterios utilizados para la selección de las estaciones de monitoreo establecidas para la extracción de muestra del cuerpo superficial, están estrechamente vinculados a los cambios en el uso efectivo del suelo, por causas antrópicas, desarrolladas en los últimos cincuenta años en la cuenca del arroyo Las Conchitas (Calvo, Cipponeri, Salvioli, Trovatto, & Alvares, 2014). Se utilizó como base comparativa un trabajo de investigación realizado en la cuenca en el año 2002 por el Instituto de Ciencias Ambientales y Salud (ICAS), Fundación PROSAMA; Instituto de Limnología “Dr. Raúl A. Ringuelet”; Universidad Nacional de La Plata (UNLP); CONICET; U.S. Geological Survey, Colorado State University; Comisión Nacional de Energía Atómica; Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de San Martín (UNSAM); Municipalidad de Florencio Varela y Municipalidad de Berazategui (Herkovits, y otros, 2003). Este trabajo de investigación planteó la importancia del uso apropiado de los recursos hídricos y la prevención de su degradación debido a que la actividad antrópica es fundamental para objetivos de desarrollo sustentable, como así también las experiencias exitosas en el manejo de cuencas hídricas revelan la necesidad de decisiones basadas en conocimientos científicos a los efectos de proteger la calidad del agua, el ecosistema y la salud humana. Realizando una caracterización de la cuenca hídrica del arroyo Las Conchitas mediante ensayos de ecotoxicidad con embriones de anfibio *Rhinella arenarum* y análisis fisicoquímico. Siguiendo con la misma línea de trabajo se utilizaron para este proyecto, las mismas estaciones de monitoreo seleccionadas en el trabajo de investigación realizado en el año 2002 sobre la cuenca.

Estas estaciones presentan características muy particulares y disímiles: Una zona con intensa actividad agropecuaria, una reserva natural, una zona industrial y una residencial exclusiva antes de que el arroyo vierta sus aguas en el estuario del Río de La Plata.

Estas estaciones de monitoreo se ubican en:

1. Intersección con Av. Guillermo Hudson. Altura Parque Ecológico Cultural Guillermo Hudson (Estación de Monitoreo N°1 - M₁); (Latitud: 34°51'21.70"S; longitud: 58°13'26.73"O) (Partido de Florencio Varela).
2. Intersección con Ruta Provincial N° 36 “Avenida Calchaquí” (Estación de Monitoreo N°2 - M₂); (Latitud: 34°49'57.00"S; longitud: 58°12'32.50"O) (Partido de Florencio Varela).
3. Intersección con Ruta Provincial N° 1 “Camino General Manuel Belgrano” (Estación de Monitoreo N°3 - M₃); (Latitud: 34°48'56.83"S; 58°11'59.02"O) (Partido de Berazategui).

4. Intersección con Autopista Buenos Aires - La Plata (Estación de Monitoreo N°4 - M4).
(34°46'18.64"S; 58° 9'58.19"O) Altura estación de peaje Hudson. (Partido de Berazategui).



FIGURA 24- LÍMITE DE LA CUENCA HÍDRICA DEL ARROYO LAS CONCHITAS CON SUS ESTACIONES DE MONITOREO. FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

Siguiendo las características antrópicas de la cuenca se definió la siguiente distribución de las estaciones de monitoreo; 1 (una) en cuenca baja, 2 (dos) en cuenca media y 1 (una) en cuenca alta.

Entendiendo que la mayor actividad industrial se desarrolla entre la Av. Guillermo Hudson y la Ruta Provincial N° 1 “Camino General Manuel Belgrano” se monitorearon 2 (dos) puntos en este tramo. Debido a que allí se ubica una gran cantidad de establecimientos industriales de complejidad ambiental alta, ya sea por la peligrosidad de las materias prima que se utilizan como así también de sus productos terminados.

Por otra parte, también se pudo determinar que aguas arriba de la Av. Guillermo Hudson se encuentra una zona de extensa actividad agropecuaria y aguas abajo de la Av. Ranelagh una zona de countries, barrios privados, club de campo y complejos recreativos que impactarían directamente con el vertido de sus efluentes cloacales sobre el cuerpo superficial del arroyo.

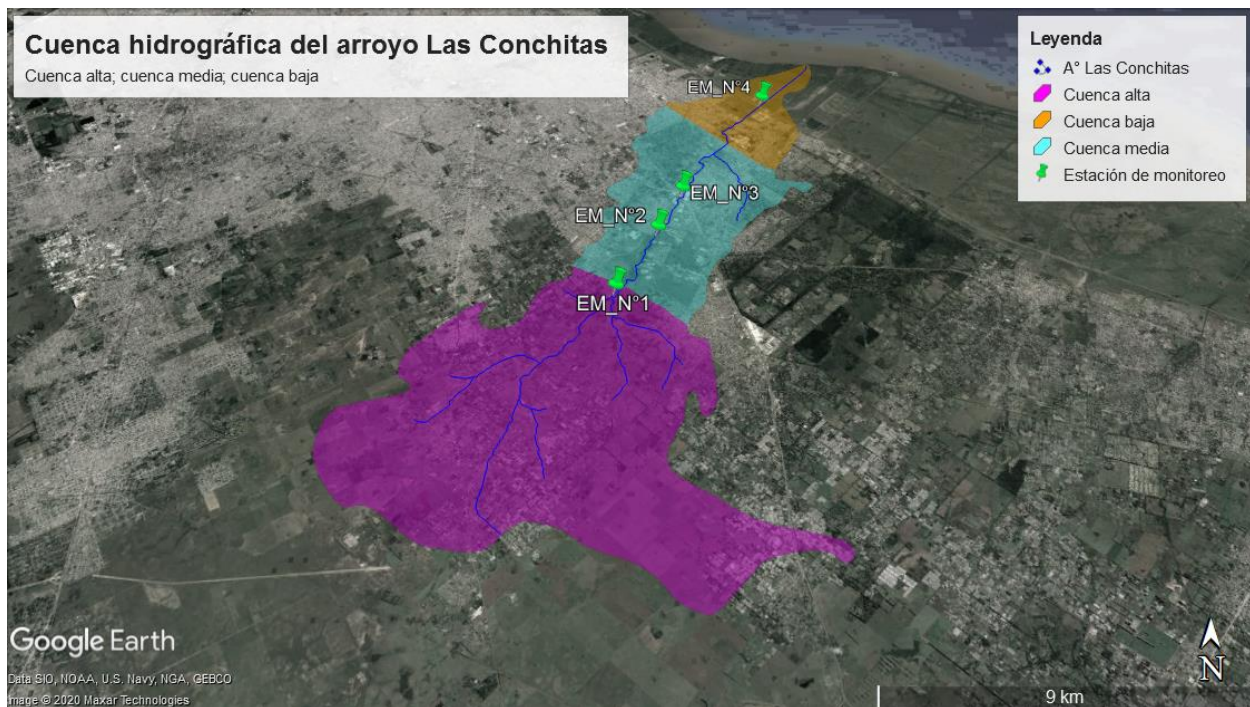


FIGURA 25- ESTACIONES DE MONITOREO Y DIVISIÓN DE CUENCA EN: CUENCA ALTA, MEDIA Y BAJA. FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

Hecha efectiva la subdivisión geográfica de la cuenca a través de la identificación de sus curvas de nivel por medio del software ArcGis 10.5, se pudieron establecer en este trabajo por primera vez las áreas afectadas a cada subcuenca. Esto sirvió para delimitar de manera conceptual el alcance geográfico del impacto ambiental de las distintas actividades antrópicas que se desarrollan en sus márgenes. Previamente, se tuvieron que cargar todos los datos correspondientes de cada estación de monitoreo al software como así también identificar las mismas mediante registros fotográficos, datos de georreferenciación, y otros de suma importancia. A continuación se puede ver como un archivo de formato “kmz” con los límites geográficos de la cuenca visibles en Google Earth se fusiona con otro de formato “shapefile” obtenido con el software ArcGis 10.5 logrando así un registro único con datos de cada estación de monitoreo al hacer “click” en cada punto de interés (ver Fig. 26/27/28/29).

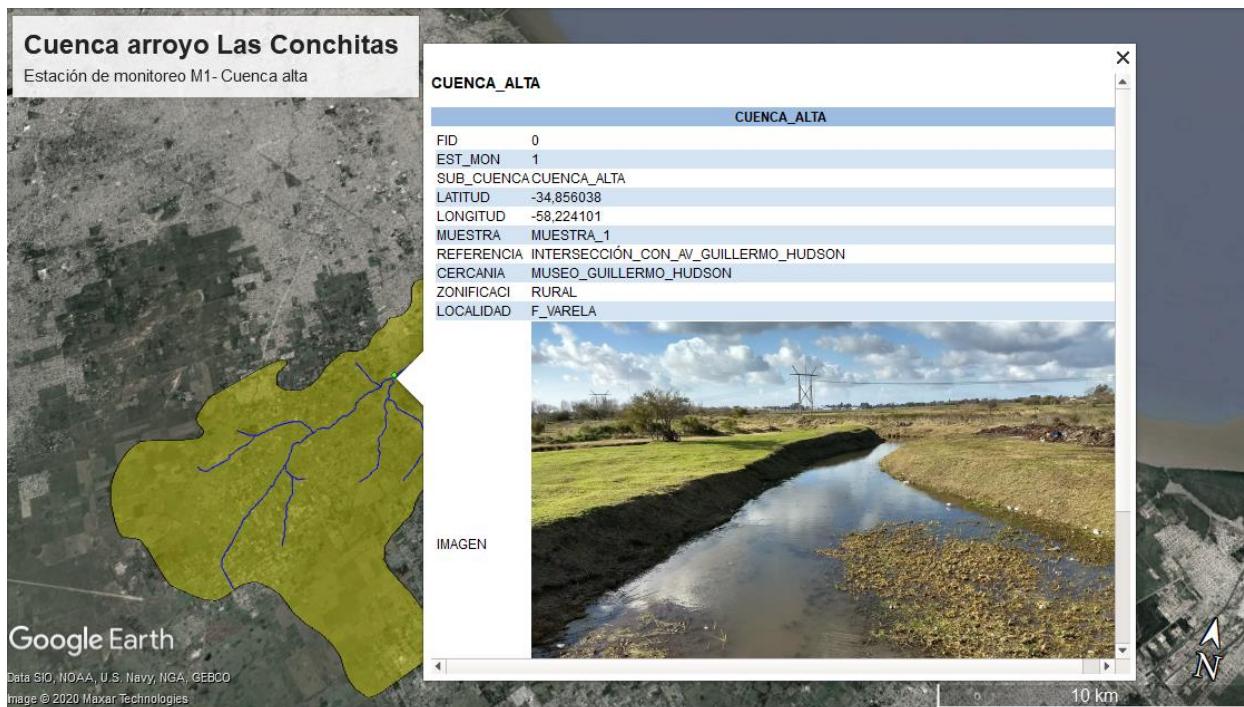


FIGURA 26- ESTACIÓN DE MONITOREO N°1: INTERSECCIÓN CON AV. GUILLERMO HUDSON, ALTURA PARQUE ECOLÓGICO CULTURAL GUILLERMO HUDSON FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

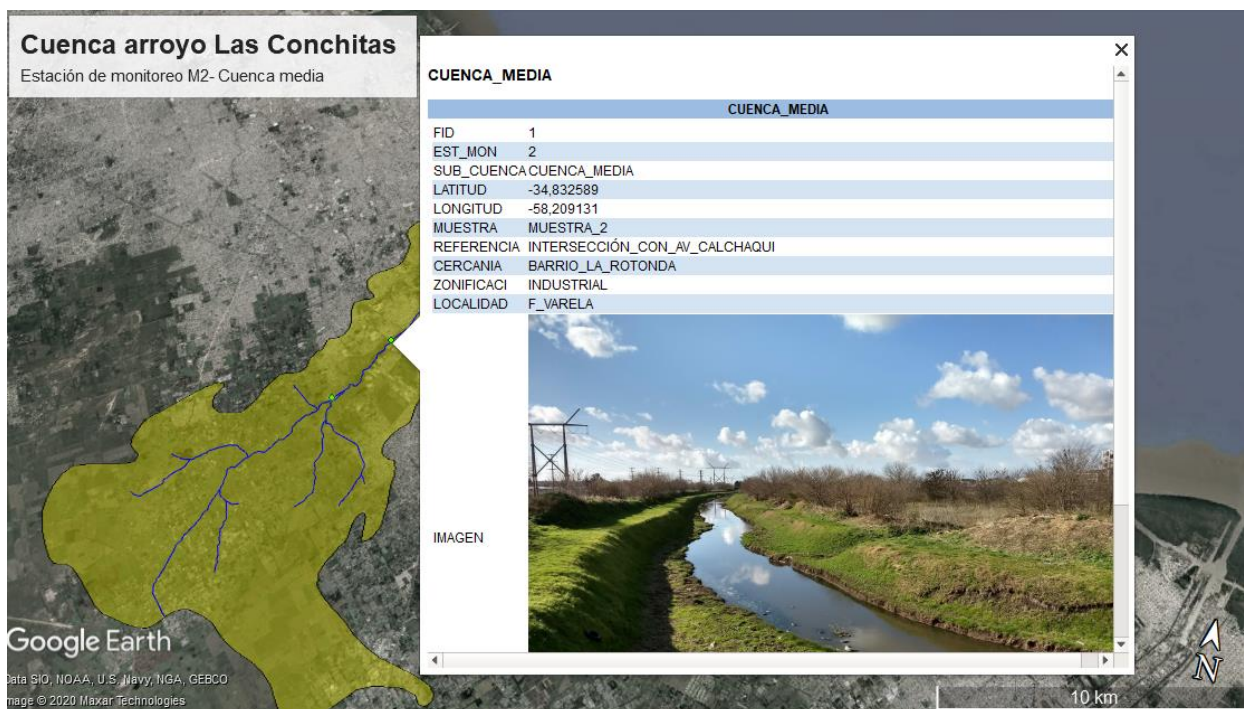


FIGURA 27- ESTACIÓN DE MONITOREO N°2; INTERSECCIÓN RUTA PROVINCIAL N°36 "Av. CALCHAQUI) FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

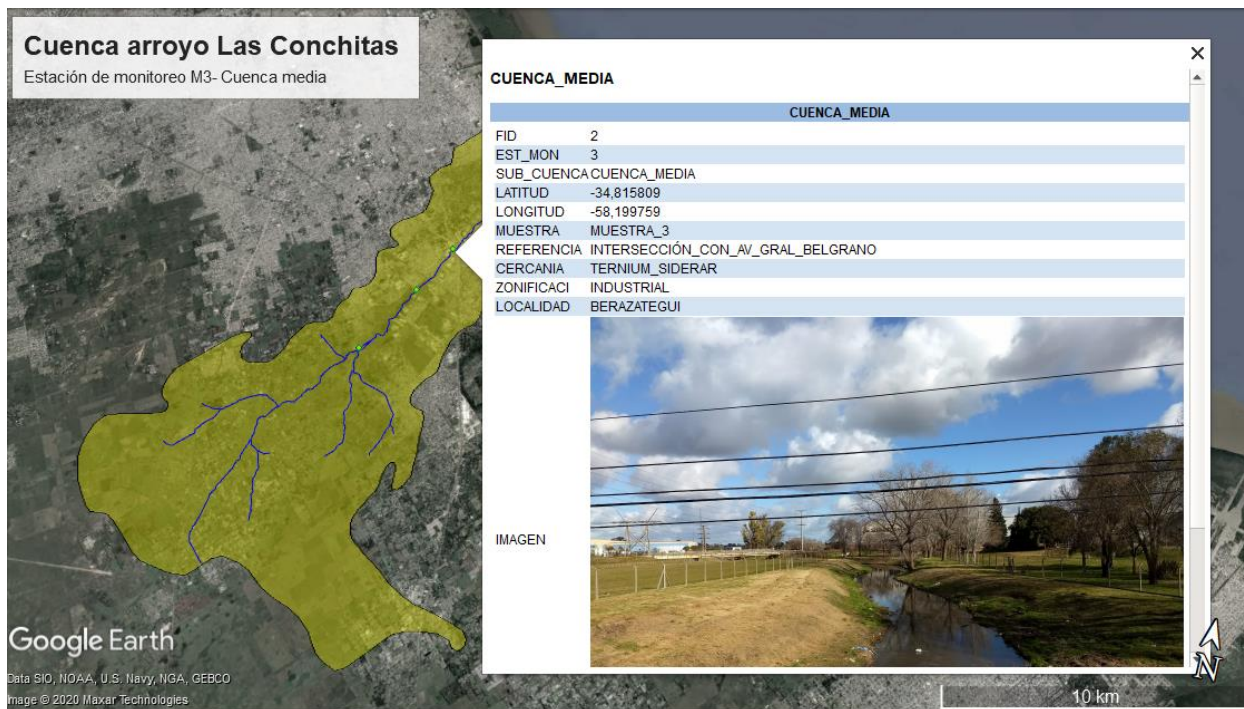


FIGURA 28- ESTACIÓN DE MONITOREO N°3; INTERACCIÓN CON RUTA PROVINCIAL N°1 “CAMINO GENERAL BELGRANO” FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

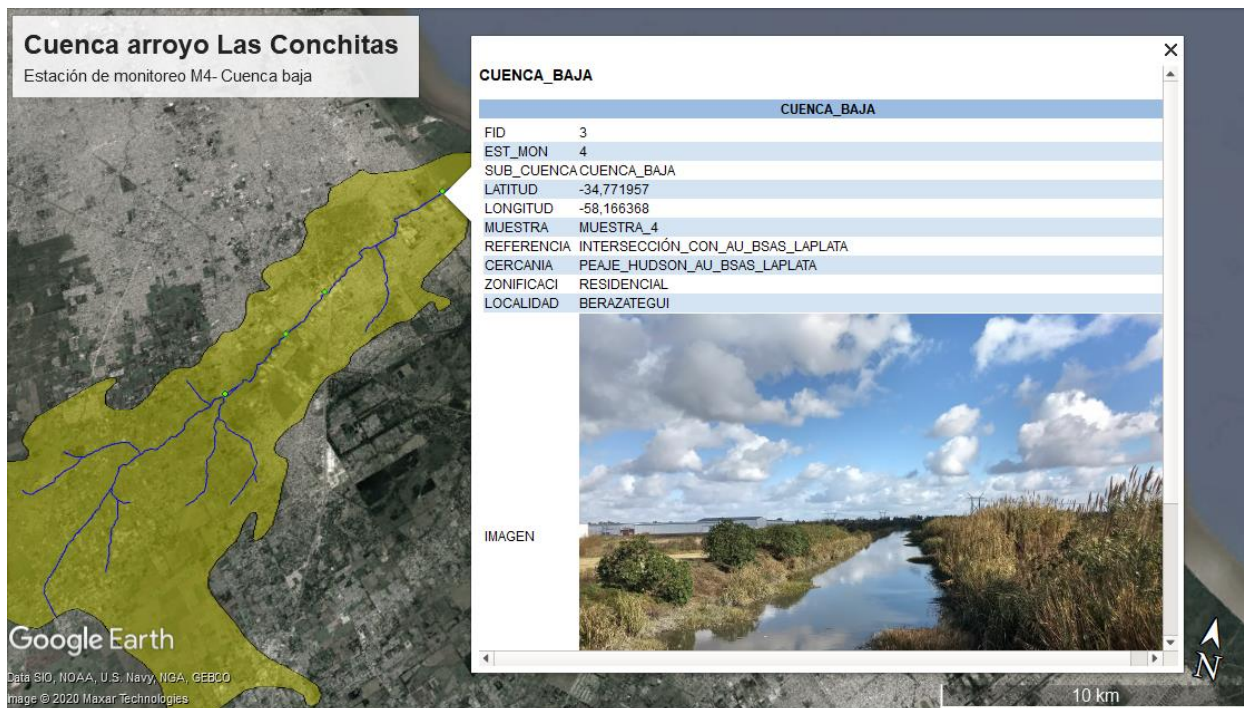


FIGURA 29- ESTACIÓN DE MONITOREO N°4; INTERACCIÓN CON AUTOPISTA BUENOS AIRES LA PLATA, ALTURA PEAJE HUDSON FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

4.2 Zonificación

La cuenca hídrica del arroyo Las Conchitas posee en toda su longitud distintas zonificaciones a medida que avanza hacia el interior del conurbano bonaerense, observándose cambios significativos en el uso del suelo durante las últimas cinco décadas (Calvo, Cipponeri, Salvioli, Trovatto, & Alvarez, 2014). Si hacemos una recorrida desde su vertiente, el estuario del Río de La Plata hacia aguas arriba, podemos encontrarnos con una zona prácticamente exclusiva de barrios privados, countries, complejos de viviendas diferenciados, club de golf, etc. todos ellos con potenciales vertidos de sus efluentes cloacales al arroyo, ya sea con o sin tratamiento. Asimismo, en convivencia con estos complejos y a escasos metros se vive otra realidad: zonas de viviendas marginales, donde efluentes cloacales se vierten a un colector pluvial con posterior destino en el arroyo o en el mejor de los casos a suelo natural por medio de pozos absorbentes.

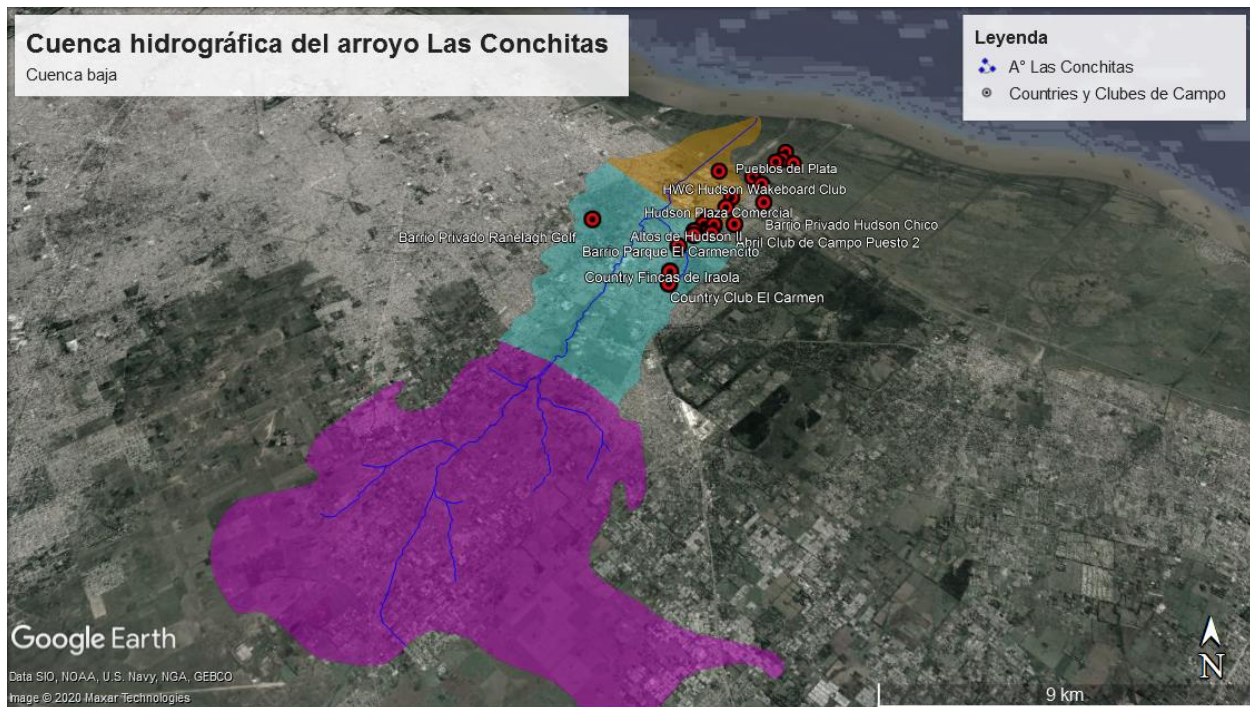


FIGURA 30 - COUNTRIES Y BARRIOS PRIVADOS CON INCIDENCIA DIRECTA O INDIRECTA PREDOMINANTEMENTE EN CUENCA BAJA. FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

Saliendo de cuenca baja, al cruzar la Av. Ranelagh la situación cambia. Inicia una zona industrial exclusiva con establecimientos de complejidad ambiental alta, todos ellos encuadrados dentro de segunda y tercera categoría ambiental según el Organismo Provincial para el Desarrollo Sostenible (OPDS) (Ley 11.459, 1993). Podemos encontrar manipulación de metales pesados como ser cromo hexavalente en curtiembres como La Hispano o níquel en industrias destinadas al galvanizado de

metales como Siderar. Además, existen grandes aportes de carga orgánica producto de la matanza de ganado vacuno en frigoríficos como La Huella. Fábrica de baterías, productos fitosanitarios, derivados del plomo e industrias químicas entre otras, son los rubros que predominan en esta zona de la cuenca. Obviamente estos tipos de establecimientos conviven con barrios del conurbano, en algunos casos y barrios residenciales en otros. Tal es el caso del barrio La Rotonda en Florencio Varela que se encuentra rodeado de una zona industrial. Limitada por la Ruta Provincial N°36 (Av. Calchaquí) y el arroyo Las Conchitas con empresas que impactan sobre las aguas del cuerpo superficial, suelo y aire de la zona. Los habitantes de este barrio fueron los primeros en hacer visible los efectos de la contaminación de las empresas (Giannuzzi & Godoy, 2006). Es aquí donde inicio todo, ya que a partir de estos reclamos constantes se creó un Comité de Crisis Ambiental dictado por la antigua Secretaría de Política Ambiental de la provincia de Buenos Aires bajo la resolución 1127/2006.

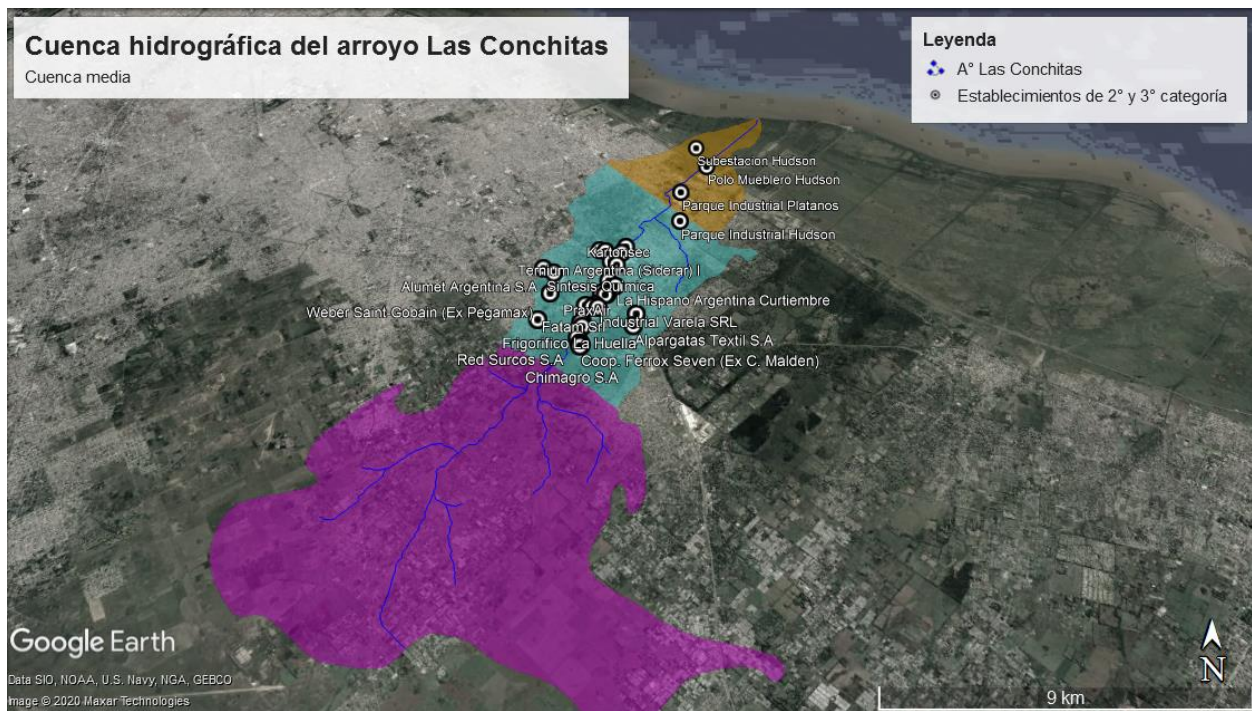


FIGURA 31- ESTABLECIMIENTOS INDUSTRIALES DE 2° Y 3° CATEGORÍA AMBIENTAL EN CUENCA MEDIA. FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

Siguiendo aguas arriba, la densidad poblacional al ser una zona rural disminuye pero allí se puede ver con mucha más claridad el impacto sobre suelo natural de los basurales a cielo abierto y la peligrosidad de antiguas tosqueras que se encuentran inactivas. Todo ello muy visible hasta la Av. Guillermo Hudson, a escasos metros de la casa y Parque Ecológico del conocido naturalista y

escritor argentino del siglo XIX Guillermo Enrique Hudson. Desde este parque en adelante hasta el Complejo Penitenciario de Florencio Varela podemos decir que la actividad agropecuaria es exclusiva en la zona.

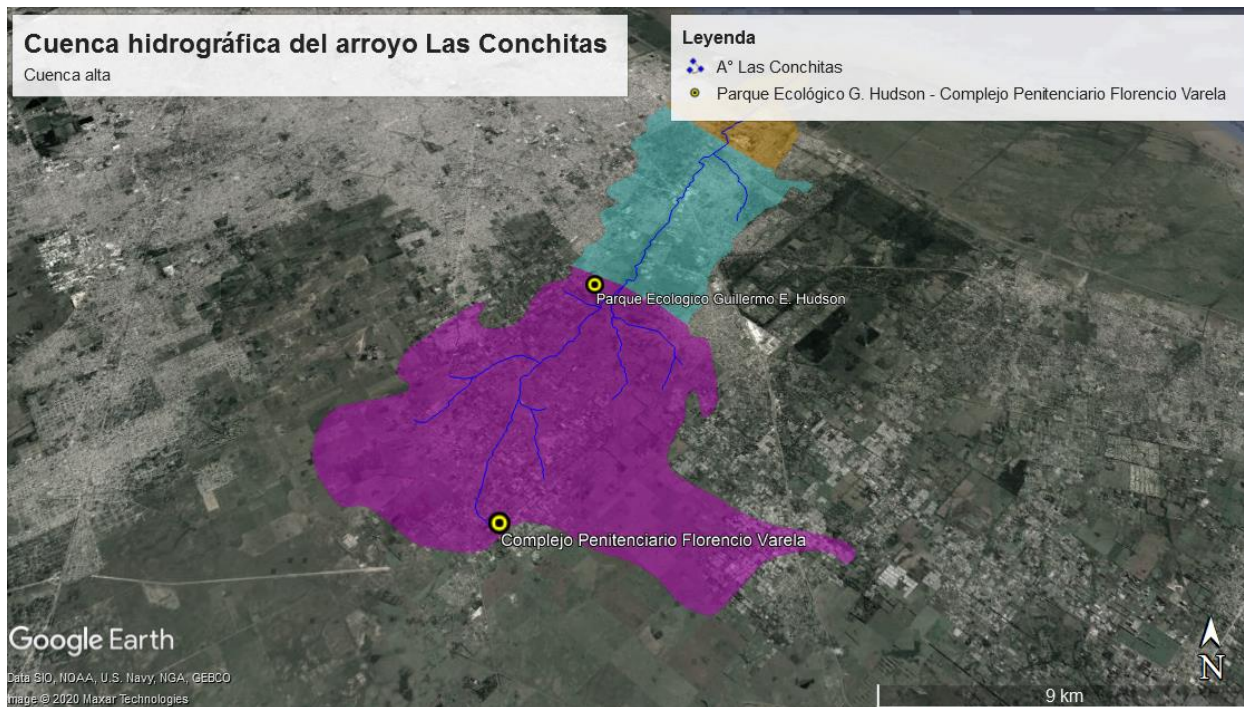


FIGURA 32- CUENCA ALTA: PARQUE ECOLÓGICO GUILLERMO HUDSON Y COMPLEJO PENITENCIARIO DE FLORENCIO VARELA.
FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

4.3 Extracción de muestras

Previamente a la extracción de muestras del arroyo se tuvo que diagramar un plan de muestreo para las 4 (cuatro) estaciones de monitoreo de la cuenca, donde se contemplaron las distintas variables que pudiesen surgir en campo para lograr obtener la mayor representatividad y eficacia en los diferentes puntos de muestreo.

También tuvo que contemplarse un factor sumamente importante, la seguridad física de las personas que intervinieron en el procedimiento de muestreo ya que 3 (tres) de las 4 (cuatro) estaciones de monitoreo se ubican en zonas inseguras. Para ello, y afortunadamente las personas destinadas a realizar dicho procedimiento fueron: quien suscribe, Especialista en Ingeniería Ambiental y certificado por la Autoridad de Cuenca Matanza Riachuelo (ACUMAR) para realizar muestreo de suelos, efluentes líquidos industriales y cuerpos superficiales; y el Licenciado en Química, Candía Alberto perteneciente al Departamento de Delitos Ambientales de la Policía

Federal Argentina. Este último además se encuentra inscripto en el Registro Nacional de Tomadores de Muestra (ReNaToM) del Consejo Profesional de Química.

Otro factor a considerar fueron las condiciones climáticas, buscando que sean lo más similares posibles al último estudio realizado sobre la cuenca (Herkovits, y otros, 2003). Por eso se decidió, en acuerdo con el director de tesis el Dr. Herkovits Jorge muestrear en el mismo periodo del año. Se seleccionó un día que no haya sufrido anteriormente intensas precipitaciones porque eso interferiría en la concentración de la muestra diluyéndola. Asimismo, el muestreo debió realizarse un día hábil para garantizar el normal desarrollo de actividades en los establecimientos industriales. El horario de muestreo coincidió con picos de productividad de las empresas. Teniendo presentes todas estas variables se definió realizar el muestreo de las 4 (cuatro) estaciones de monitoreo el día jueves 27 de junio de 2019 iniciando el mismo a las 10 hs y finalizándolo a las 15 hs. Todas las muestras extraídas en cada estación de monitoreo se hicieron por duplicado, fueron trasvasadas de forma manual a envases vírgenes de polietileno con capacidad de 3 L adquiridos directamente de fábrica. Cada envase se rotulo debidamente como los siguientes datos: Título del trabajo, fecha, hora, identificación de la estación de monitoreo, tipo de muestra y número de muestra. Este rótulo fue confeccionado previamente y contemplado en el plan de monitoreo para que luego en campo fuese de fácil aplicación (*ver Ilustración 1*). Una vez extraída la muestra previo a su trasvase, se midieron parámetros *in situ* (pH, conductividad, oxígeno disuelto y temperatura) con equipo multiparamétrico marca Hach HQ40D debidamente calibrado. Este equipo nos permitió obtener un primera diagnóstico rápido de la calidad del agua del arroyo sin la necesidad de tener que usar otros instrumentos. Además nos permitió georreferenciar cada punto de extracción (*ver Ilustración 4*).

Todo el procedimiento de muestreo, conservación y traslado de las muestras se realizó siguiendo las recomendaciones establecidas por las normas del Instituto Argentino de Normalización y Certificación (IRAM) (IRAM 29012-10, 1995).



ILUSTRACIÓN 3-ELEVACIÓN DE MUESTRA DESDE EL PUENTE DE LA AV. CALCHAQUÍ (ESTACIÓN MONITOREO M3), TRASVASO Y REGISTRO.



ILUSTRACIÓN 2- MEDICIÓN Y REGISTRO *IN SITU* DE PARÁMETROS CON MULTIPARAMÉTRICO (ESTACIÓN MONITOREO M2)



ILUSTRACIÓN 4- EQUIPO MULTIPARAMÉTRICO HACH HQ40D UTILIZADO EN CAMPO



ILUSTRACIÓN 1- MUESTRA ENVASADA Y ROTULADA EN CAMPO (ESTACIÓN DE MONITOREO M4). ELEVACIÓN DE MUESTRA, REGISTRO Y LIMPIEZA DE EQUIPO MULTIPARAMÉTRICO.

PLAN DE MUESTREO				
<i>Estudio Ecotoxicológico en la Cuenca Hídrica del arroyo Las Conchitas con embriones de anfibios</i>				
DOCUMENTACIÓN DE CAMPO				
FECHA	27/06/2019			
HORA	11.00 13.00	11.30 13.30	12.00 14.00	12.30 14.30
EST. DE MONITOREO	EST. M-1	EST. M-2	EST. M-3	EST. M-4
TIPO DE MUESTRA	AGUA SUP.		SEDIMENTO	
N° DE MUESTRA	1 5	2 6	3 7	4 8

4.4 Parámetros físicoquímico de las muestras extraídas en las estaciones de monitoreo

4.4.1 Parámetros *in situ*

Al momento de realizar el muestreo del arroyo Las conchitas se realizó la medición de una serie de parámetros *in situ*. Para luego contrastarlos con los análisis de laboratorio.

Parámetros	M1	M2	M3	M4
pH	8,14	8,69	8,26	8,07
Temp (°C)	10,8	14,7	13,8	12,0
Conductividad (µs/cm)	980	2092	2330	1735
Oxígeno disuelto (mg/L)	6,73	9,23	3,70	3,32

CUADRO 1- PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS MEDIDOS EN CAMPO (*IN SITU*). INSTRUMENTAL EMPLEADO: MULTIPARAMÉTRICO MARCA HACH, MODELO HQ40D; SONDA DE PH MODELO PHC101 Y SONDA DE OXÍGENO DISUELTO LBOD101.

4.4.2 Parámetros *ex situ*

Se recepcionó en laboratorio, dos conservadoras. En cada una de ella, se trasladaron 2 (dos) bolsas negras de polietileno debidamente precintadas y refrigeradas con gel líquido correspondiente al muestreo de 2 (dos) estaciones de monitoreo del arroyo Las Conchitas. Recepcionada y realizada la apertura de las bolsas, se chequea que las actas de toma de muestras realizadas en campo coincidan con los datos de los envases; identificación, características de las muestras, precintos, cadena de custodia, etc. Cada bolsa contiene 2 (dos) envases de polipropileno de 3 L, original y duplicado correspondiente al muestreo de una estación de monitoreo.

Un envase fue destinado para los ensayos de toxicidad y otro para los ensayos físicoquímico en *ex situ*.

A continuación se muestra la recepción en laboratorio de las muestras ambientales y el desarrollo de los análisis físicoquímicos realizados *in situ* y *ex situ*:



ILUSTRACIÓN 5- - RECEPCIÓN DE MUESTRAS EN LABORATORIO PARA ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS. DE DERECHA A IZQUIERDA; M1, M2, M3, M4

Muestra	Tipo de muestra, envase e identificación
Estación monitoreo 1 (M1)	Muestra líquida contenida en 1 bidón de plástico capacidad 3 litros, lleno en su totalidad.
Estación monitoreo 2 (M2)	Muestra líquida contenida en 1 bidón de plástico capacidad 3 litros, lleno en su totalidad.
Estación monitoreo 3 (M3)	Muestra líquida contenida en 1 bidón de plástico capacidad 3 litros, lleno en su totalidad.
Estación monitoreo 4 (M4)	Muestra líquida contenida en 1 bidón de plástico capacidad 3 litros, lleno en su totalidad.

CUADRO 2- MUESTRA ANALIZADA, SU IDENTIFICACIÓN, TIPO DE MUESTRA Y ENVASE

Parámetros	M1	M2	M3	M4
Aspecto	Líquido pardo claro	Líquido gris oscuro	Líquido gris claro	Líquido pardo claro
Olor	Inodoro	Inodoro	Inodoro	Inodoro
Observaciones	Con poco sedimento en la base	Con considerable sedimento en la base	Con considerable sedimento en la base	Con considerable sedimento en la base

CUADRO 3- CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DETERMINADAS SOBRE LA MUESTRA

Parámetros	M1	M2	M3	M4
pH	7,9	8,5	8,1	7,8
TDS (mg/l)	276	1409	1173	900
Conductividad (µs/cm)	453	2230	1875	1462
Oxígeno disuelto (mg/L)	6,60	9,03	3,55	3,12

CUADRO 4- PARÁMETROS FISCOQUÍMICOS DETERMINADOS *EX SITU* SOBRE LA MUESTRA EN EL LABORATORIO. INSTRUMENTAL EMPLEADO: MULTIPARAMÉTRICO MARCA HACH, MODELO HQ40D; SONDA DE PH MODELO PHC101 Y SONDA DE OXÍGENO DISUELTO LBOD101. ESPECTROFOTÓMETRO MARCA HACH, MODELO DR6000.

Parámetros	M1	M2	M3	M4
DQO (mg/l)	20	24	49	22
DBO (mg/l)	12	14	37	13
SULFUROS (mg/l)	0,042	0,052	0,193	0,060
SSEE (mg/l)	58	6	4	8

CUADRO 5- PARÁMETROS BIOLÓGICOS Y QUÍMICOS DETERMINADOS *EX SITU* SOBRE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO

Parámetros	M1	M2	M3	M4
NIQUEL (mg/l)	0,021	0,090	0,042	0,044
COBALTO (mg/l)	0,084	0,118	0,225	0,099
CROMO TOTAL (mg/l)	No detectable	No detectable	0,07	No detectable
COBRE (mg/l)	0,02	0,05	No detectable	No detectable

CUADRO 6- PARÁMETROS QUÍMICOS DETERMINADOS *EX SITU* SOBRE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO. INSTRUMENTAL EMPLEADO: ESPECTROFOTÓMETRO MARCA HACH, MODELO DR6000.

Metodología empleada

- Demanda química de oxígeno (DQO): Técnica de digestión acida en reactor, Método 8000 Hach, adaptado de “Jirka, A.M.; Carter, M.J., Analytical Chemistry, 1975, 47(8), 1397”.
- Demanda biológica de oxígeno (DBO): Método de medición de oxígeno disuelto por luminiscencia, Método Hach 10360, APHA. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th ed. APHA, Washington, DC.

- Sulfuros totales: Técnica de Azul de metileno, Método 8131 Hach, adaptado de “APHA-AWWA-WPCF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 15^oed. 1980”.
- Sustancias solubles en éter etílico (SSEE). Standard Methods for the examination of water and wastewater (A.P.H.A.) 6a. edición (modificada por Obras Sanitarias de la Nación).
- Cobalto: Método del 1-(2 piridilazo) -2-naftol (PAN), Método 8079 Hach, adaptado de Watanbe, H., Talanta, 21 295 (1974).
- Cobre: Método de Bicinchoninato, Método 8506 Hach, aceptado por la USEPA (United States Environmental Protection Agency-Agencia de Protección Ambiental de los E.E.U.U) para análisis de aguas residuales. Técnica adaptada de Nakano, S., Yakugaku Zasshi, 82, 486-491 (1962). Chemical abstratcs, 583390e (1963).
- Níquel: Técnica de 1-(2-Piridilazo) -2-naftol (PAN), Método 8078 Hach, adaptado de Watanabe H. Talanta, 21, 295. 1974.
- Cromo Total: Técnica de oxidación alcalina con Hipobromito, Método 8024 Hach adaptado de Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Procedimiento equivalente al “Standard Method 3500-CRD for wastewater”.

CAPÍTULO 5:
BIOENSAYOS DE TOXICIDAD,
DISEÑO EXPERIMENTAL I:
EMBRIONES DE ANFIBIOS

5.1 Materiales y métodos generales

5.1.1 Obtención del material biológico vertebrado I – *Rhinella arenarum*

Los embriones pueden ser obtenidos y criados rápidamente en gran número con métodos sencillos y económicos en laboratorio. Por cada pareja de anfibio pueden llegar a obtenerse hasta 10.000 embriones induciendo la ovulación de hembras maduras y fertilizando “*in vitro*” los ovocitos. La ovulación puede ser inducida ya sea por la administración (inyección intraperitoneal) de un macerado de hipófisis homólogas o de una mezcla de hormonas heterólogas, desde 1.000 hasta 5.000 UI de gonadotrofina coriónica y 250-500 UI de gonadotrofina sérica, utilizando una jeringa tipo tuberculina (Herkovits & Perez-Coll, 1999).

Para este estudio fueron recolectados de un sitio natural no impactado de la localidad de San Vicente, provincia de Buenos Aires, Argentina (35° 00′ 57.1068″ S; 58° 25′ 37.4304″ O), ejemplares adultos de *Rhinella arenarum* (200-250 gr). Se seleccionaron sapos saludables y sexualmente maduros. El mantenimiento de los animales, la ovulación y la obtención de los embriones se realizó de acuerdo al protocolo ANFITOX (Herkovits & Perez-Coll, 1999).

Para la obtención de embriones en los bioensayos de toxicidad se indujo la ovulación de hembras adultas por la administración de una inyección subcutánea de una suspensión conteniendo el macerado de una hipófisis homóloga por hembra (Pisanó, 1956) en 1 mL de solución ANFITOX (SA). Al no obtener respuesta a la estimulación efectuada al cabo de 24 hs, se tomó la determinación de estimularlas nuevamente. Las hembras se mantuvieron a 25°C durante 48 hs antes de la estimulación. Luego de 16 a 24 horas post segunda inducción, las hembras comenzaron a ovular. En ese momento fueron “exprimidas” mecánicamente por suave compresión abdominal con el fin de completar la expulsión de los oocitos que son liberados dentro de las ristras de gelatina.

Una vez iniciada la ovulación se practicó la desmedulación de los machos, se abrieron ventralmente haciendo un corte longitudinal (parasagital) desde caudal hacia cefálico tratando de no cercenar los vasos sanguíneos grandes, se extrajeron los testículos (retroperitoneales), que fueron macerados en SA con el fin de obtener una suspensión de espermatozoides al 10%. La viabilidad de los espermatozoides fue comprobada por observación de la motilidad y morfología al microscopio óptico.

Los oocitos remanentes en los ovisacos fueron extraídos por disección y colocados en bandejas plásticas apenas humedecidas con solución ANFITOX (SA) (ver Fig.33).

Composición SA: Cloruro de Sodio (NaCl) 36 mg/L, Cloruro de Potasio (KCl) 0,5 mg/L, Cloruro de Calcio (CaCl₂) 1 mg/L, Bicarbonato de Sodio (NaHCO₃) 2 mg/L disueltos en agua destilada, asegurando la disponibilidad de oxígeno (Herkovits, Pérez-Coll, & Herkovits, 2002).

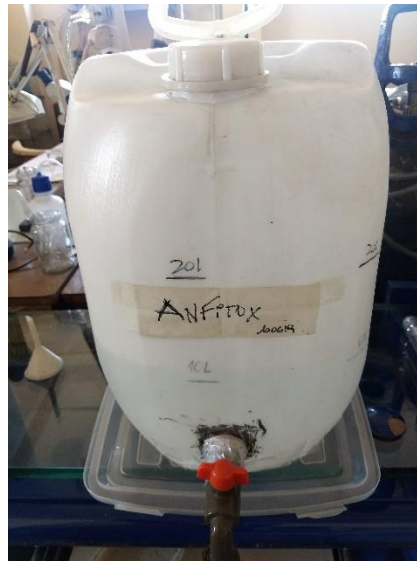


ILUSTRACIÓN 6- SOLUCIÓN DE ANFITOX PRODUCIDA EN LABORATORIO Y CONTENIDA EN ENVASE DE 40 L.

La fecundación de los oocitos se realizó pincelándolos con una suspensión de macerado testicular preparado en 1 mL de SA. La viabilidad de los espermatozoides fue confirmada observando su movimiento y morfología bajo microscopio estereoscópico binocular (ZEISS Stemi DV4).

El material biológico se mantuvo en SA hasta el estadio en que fueron utilizados para los bioensayos (E25). La solución fue renovada cada 72 hs, momento en el cual los embriones detenidos o muertos fueron retirados de las bandejas. También fue monitoreada diariamente, para asegurarse que los valores de pH de la SA fueran aceptables ($7\pm 0,5$). Los estadios embrionarios fueron clasificados de acuerdo procedimiento (Del Conte & Sirlin, 1951).

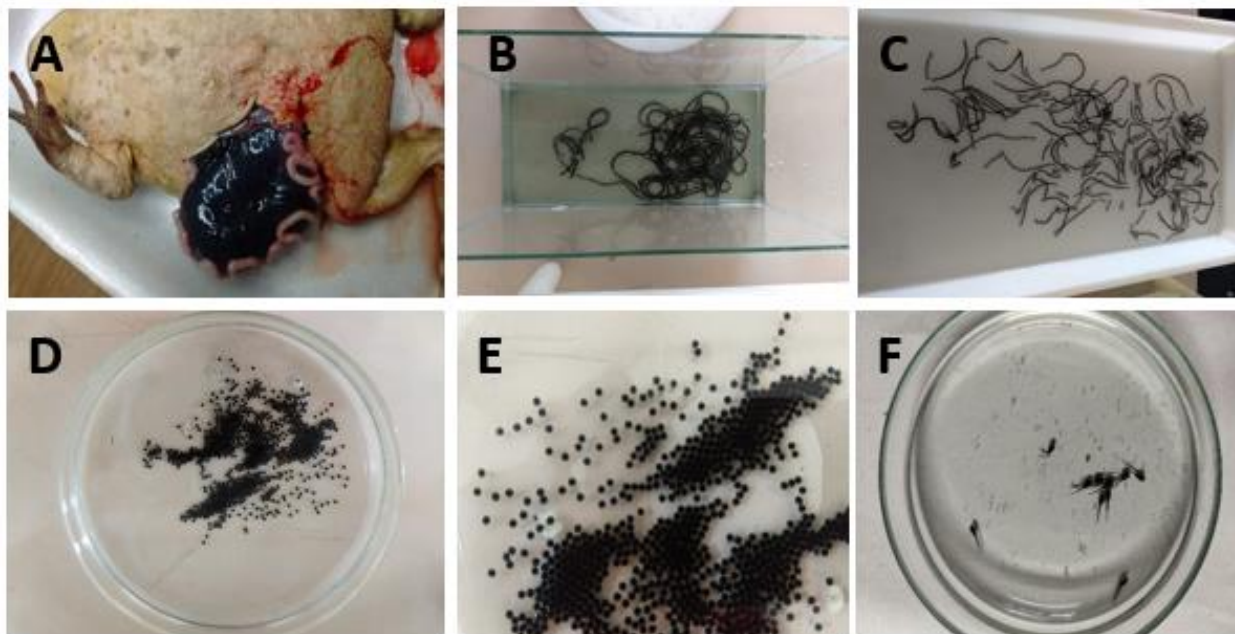


FIGURA 33- IMÁGENES OBTENIDAS CON CÁMARA DIGITAL QUE MUESTRAN LA SECUENCIA DEL PROTOCOLO ANFITOX PARA LA OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO: (A) HEMBRA *RHINELLA ARENARUM* DISECCIONADA; (B) RISTRA DE HUEVOS RECIÉN FECUNDADOS INMERSOS EN LA GELATINA; (C) RISTRA DE HUEVOS EN SA; (D) SELECCIÓN DE EMBRIONES; (E) HUEVOS FECUNDADOS LUEGO DE LA DESGELATINIZACIÓN; (F) EMBRIONES (E25).

5.1.2 Criterio de aceptación del material biológico

La calidad y fertilidad de los huevos fueron inspeccionadas, considerando aceptable una tasa de fecundación mayor que el 75% y más de un 70% de sobrevivida de embriones normales al alcanzar el estadio de opérculo (E25) (Herkovits & Perez-Coll, 1999).

5.1.3 Bioensayos de toxicidad

Un bioensayo es un experimento para estimar la naturaleza, constitución o efecto de una muestra mediante las respuestas que puedan registrarse en el organismo test utilizado o en un conjunto de ellos. Un bioensayo uniespecífico típico involucra un estímulo o dosis absorbible que es aplicada a un individuo cuya respuesta es estimada mediante la detección y evaluación de cambios en algunas características biológicas o el estado del sujeto, que hayan ocurrido luego de un determinado tiempo de exposición. Así, el objetivo primario de un bioensayo de toxicidad es determinar la toxicidad de una sustancia, una mezcla de ellas, o una muestra ambiental, que son objeto de examinación, los bioensayos siempre incluyen en su diseño la determinación de la toxicidad de un patrón toxicológico conocido o de referencia (Ossama, 2011).

Para el desarrollo del diseño experimental con embriones de *rhinella arenarum* se determinó aplicar diluciones volumen/volumen (v/v) de muestra ambiental al: 40% ^{v/v}; 60% ^{v/v}; 80% ^{v/v}; 100% ^{v/v}). Por ejemplo: se tomaron 40 mL de muestra y se llevó a volumen final en un matraz de 100 mL con solución ANFITOX (SA). Estos rangos de las diluciones en los bioensayos permitieron estimar las distintas concentraciones letales a fin de obtener las curvas de toxicidad de la muestra ambiental a diferentes tiempos de exposición.

Básicamente, se realizó el siguiente diseño experimental:

- 1) Exposición continua a partir del desarrollo embrionario (E25) en distintos periodos de tiempo: test agudo (ANFIAGU) de 96 h de exposición, un test crónico corto (ANFICOR) de 168 h (7 días) de exposición y un test crónico (ANFICRO) de 336 h (14 días) (Herkovits & Perez-Coll, 1999). De acuerdo a (USEPA, 1991) tratamientos crónicos en organismos de vida libre se consideran a partir de 7 días de exposición.

Con los datos provenientes de cada de test individual se construirán las curvas concentración-respuesta para la mortalidad (pudiéndose también registrar algunos efectos subletales como ser; retraso en el desarrollo, incurvaciones en el eje, ausencia de la aleta ventral de la cola, etc.).

Los test ANFITOX propuestos tienen como condiciones generales:

- 1) La exposición de los embriones es continua a través del test y la renovación de las soluciones es diaria, o cada 48 hs en los test crónicos cortos, crónicos o con estadíos tempranos de desarrollo.
- 2) Para cada muestra se utilizaron cámaras con 10 embriones en (E25), cada una con 40 ml de solución MUESTRA/ANFITOX dependiendo de la dilución; los controles también se realizan de igual manera.
- 3) Los embriones deben ser asignados a las cámaras al azar, al igual que la disposición espacial de las cámaras.
- 4) A fin de evaluar la toxicidad sobre el desarrollo embrionario se registrarán en tablas la información correspondiente a la sobrevivencia.

5.1.3.1 Test agudo (ANFIAGU)

Para la realización de este test propone la utilización de embriones de *rhinella arenarum* en los estadíos de su desarrollo (E23, E24 o E25). Cabe destacar que los embriones de anfibio van

adquiriendo progresivamente una mayor resistencia a los tóxicos a partir de los estadios néurula hasta la etapa final del desarrollo embrionario en que la susceptibilidad se mantiene relativamente constante durante las 96 horas subsiguientes y más (Del Conte & Sirlin, 1951). Si bien los test agudos pueden realizarse por tiempo menores (24, 48, 72 horas), los efectos tóxicos de determinadas sustancias, formulados, efluentes y ciertas muestras de aguas superficiales y subterráneas se expresan recién después del cuarto día de exposición. Considerando que los estándares internacionales reconocen como agudo los test hasta las 96 horas de tratamiento, corresponde informar sobre todo en caso de obtenerse efecto tóxico antes, los resultados a las 96 h de exposición registrando los resultados parciales a las 24, 48 y 72 horas de exposición (USEPA, 1988).

5.1.3.2 Test crónico corto (ANFICOR)

Para la realización de este test propone la utilización de embriones de *rhinella arenarum* en los estadios de su desarrollo (E23, E24 o E25). Si bien el período organogénico en esta etapa del desarrollo está culminando y no es recomendable para evaluar efectos teratogénicos (malformaciones), la susceptibilidad a las sustancias tóxicas continua siendo elevada y se puede homologar a un test de estadios tempranos de desarrollo en el que se evalúa solamente sobrevida durante 7 (siete) días.

5.1.3.3 Test crónico (ANFICRO)

Este test utiliza embriones de *rhinella arenarum* en los últimos estadios de su desarrollo (E23, E24 o E25), con exposición del tóxico por más de 10 días. Se recomienda la evaluación de los efectos sobre la sobrevida de los embriones durante 14 días informando la mortalidad en forma parcial cada 24 horas de tratamiento.

Este test permite evaluar muestras de baja toxicidad como por ejemplo, aguas subterráneas y cuerpos receptores en puntos alejados en los sitios de descarga de efluentes.

5.1.4 Condiciones de los bioensayos

Los bioensayos de toxicidad se realizaron según el método estandarizado ANFITOX (Herkovits & Perez-Coll, 1999). Se colocaron 10 embriones en E25 en cápsulas de Petri de 10 cm de diámetro tapadas, formando cámaras, con 40 mL de muestra ambiental diluida en ANFITOX. Simultáneamente se mantuvieron individuos control en SA. Los ensayos fueron semiestáticos con renovación de las soluciones cada 24 hs. Con cada cambio de solución, se realizó una revisión en

microscopio óptico a fin de observar malformaciones, retrasos madurativos y retirar los individuos sin vida. El cambio de estas solución se hizo por medio de succión con una pipeta lo más rápidamente posible pero evitando succionar o dañar los embriones. Si existe mucho material orgánico proveniente de la desintegración de los embriones se podrá reemplazar la cámara test.

Durante todo el desarrollo del test, la temperatura se mantuvo estable en 20 +/- 21°C. Las eventuales variaciones en la temperatura de muy corta duración no afectan los resultados de los test. Las altas o bajas temperaturas pueden incrementar las malformaciones y/o mortalidad ya que representan un estrés adicional al tóxico evaluado (Pérez Coll, Herkovits, & Salibián, 1986). Por ello se mantuvo un ambiente con temperatura controlada por medio de un equipo de aire acondicionado frío-calor durante todo el desarrollo del estudio. Los ensayos se realizaron sin alterar las condiciones originales en las que fueron extraídas las muestras del arroyo (excepto temperatura) ya que el concepto es evaluar en forma integrada la toxicidad de todas las condiciones fisicoquímicas que caracterizan cada muestra.

5.1.5 Registro y análisis de los datos

La sobrevida de los embriones se registró en tablas y los embriones muertos fueron extraídos cada 24 h al renovarse el medio, a fin de evitar la contaminación por microorganismos. Este registro se hizo durante las 336 h que duró el ensayo. La muerte se diagnosticó por pérdida de la integridad, ausencia de movimiento ciliar y por ausencia de latido cardíaco.

La inhibición del crecimiento es otro indicador muy sensible de toxicidad durante el desarrollo embrionario y es relativamente para cuantificar. El desarrollo del crecimiento embrionario fue observado bajo microscopio estereoscópico binocular (ZEISS Stemi DV4), y fotografiado con una cámara digital Sony DSC-90. La sobrevida fue registrada diariamente hasta los 14 días de exposición. Los datos fueron transformados en Unidades de Toxicidad aguda ($UT_a = 100/LC_{50}$) y Unidades de Toxicidad crónica ($UT_c = 100/NOEC$).



ILUSTRACIÓN 7- PROCESO DE REVISIÓN, SELECCIÓN Y RETIRO DE MATERIAL CON PRESENCIA DE ANORMALIDADES Y SIN VIDA.

5.2 Toxicidad del arroyo sobre el desarrollo embrionario del *rhinella Arenarum*

5.2.1 Preparación de las diluciones de exposición

Los bioensayos de toxicidad se realizaron utilizando diluciones volumen/volumen (v/v) de muestra ambiental sobre solución de ANFITOX (SA). Se prepararon diluciones al 40% ^{v/v}; 60% ^{v/v}; 80% ^{v/v} y 100% ^{v/v} para cada estación de monitoreo. Se realizaron controles con solución ANFITOX (SA) en paralelo a estas diluciones. Las soluciones se analizaron a diario a fin de comprobar su estabilidad en el tiempo.

Por ejemplo para la Estación de Monitoreo (EM1): se tomaron 16 mL de muestra y se llevó a volumen final en una probeta de 40 mL con SA (Muestra al 40 % ^{v/v}). Esta metodología fue empleada para el resto de las diluciones. Los rangos de las diluciones en los ensayos fueron necesarios para estimar las distintas diluciones letales a fin de obtener las curvas de toxicidad de la muestra a diferentes tiempos de exposición.

5.2.2 Bioensayos de toxicidad

Para cada estación de monitoreo se realizaron los siguientes ensayos:

- Concentración al 100 % ^{v/v}: Se colocaron 10 embriones de *rhinella arenarum* (E25) en una placa de Petri de 10 cm de diámetro con 40 mL de MUESTRA al 100 %. Simultáneamente se mantuvieron individuos control en SA.
- Concentración al 80% ^{v/v}: Se colocaron 10 embriones de *rhinella arenarum* (E25) en una placa de Petri de 10 cm de diámetro con 40 mL de una dilución al 80 % ^{v/v} MUESTRA/ANFITOX. Simultáneamente se mantuvieron individuos control en SA.
- Concentración al 60% ^{v/v}: Se colocaron 10 embriones de *rhinella arenarum* (E25) en una placa de Petri de 10 cm de diámetro con 40 mL de una dilución al 60 % ^{v/v} MUESTRA/ANFITOX. Simultáneamente se mantuvieron individuos control en SA.
- Concentración al 40% ^{v/v}: Se colocaron 10 embriones de *rhinella arenarum* (E25) en una placa de Petri de 10 cm de diámetro con 40 mL de una dilución al 40 % ^{v/v} MUESTRA/ANFITOX. Simultáneamente se mantuvieron individuos control en SA.

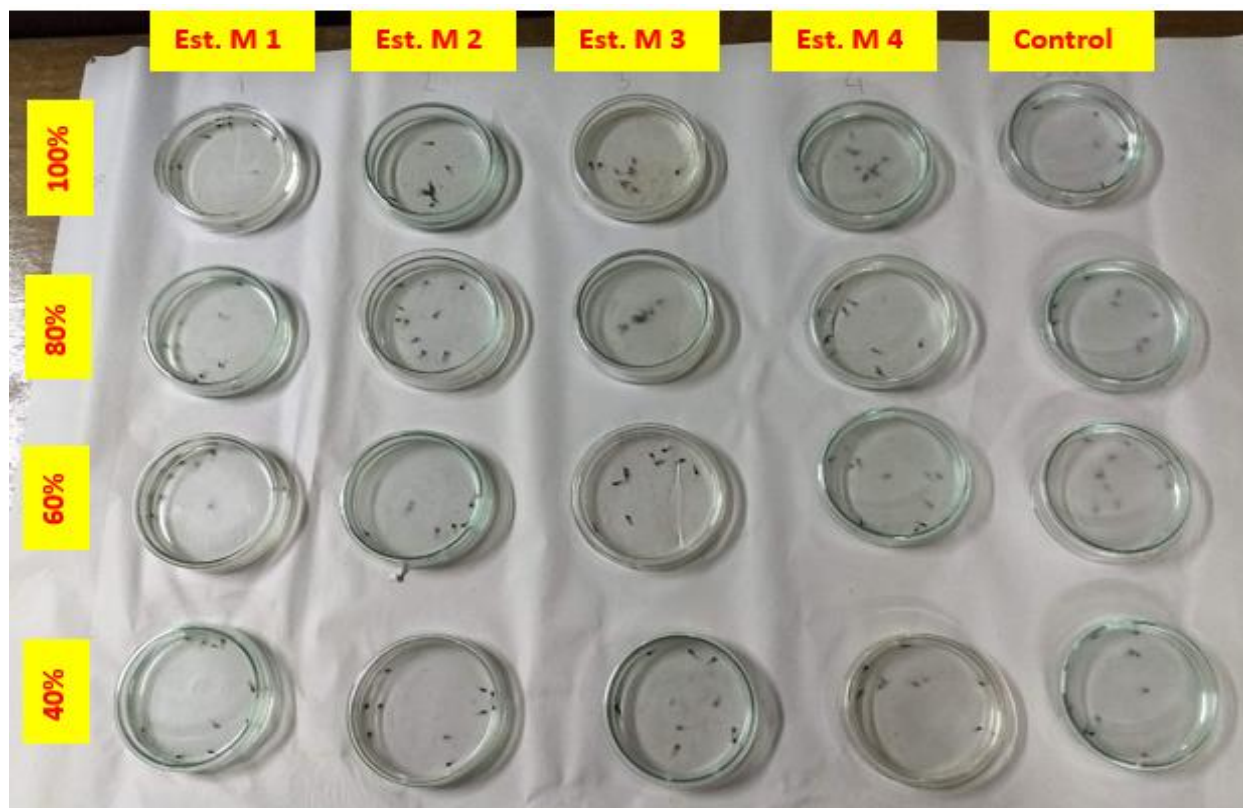


ILUSTRACIÓN 8- COLUMNA IZQUIERDA: DILUCIONES UTILIZADAS; FILA SUPERIOR: MUESTRAS DE LAS DISTINTAS ESTACIONES DE MONITOREO DEL ARROYO LAS CONCHITAS Y CONTROLES.

5.3 Registro de sobrevida de embriones *rhinella arenarum* a partir del E25 cada 24 (h)

ESTACIÓN DE MONITOREO 1 - CUENCA HÍDRICA ARROYO LAS CONCHITAS																
Concentración (%)	ANFITOX - EMBRIONES <i>RHINELLA ARENARUM</i> (E25)															Sobrevida (%)
	TIEMPO DE EXPOSICIÓN															
	ANFIAGU					ANFICOR			ANFICRO							
	15-jul	16-jul	17-jul	18-jul	19-jul	20-jul	21-jul	22-jul	23-jul	24-jul	25-jul	26-jul	27-jul	28-jul	29-jul	
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h	240 h	264 h	288 h	312 h	336 h	
100	10	10	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	8	91%
80	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	100%
60	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	100%
40	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	100%
Control	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9	9	9	8	8	8	91%

CUADRO 7- REGISTRO DE SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES DE *RHINELLA ARENARUM* A PARTIR DEL E25 CADA 24 HS PARA LA ESTACIÓN DE MONITOREO 1 DURANTE 336 (H)

ESTACIÓN DE MONITOREO 2 - CUENCA HÍDRICA ARROYO LAS CONCHITAS																
Concentración (%)	ANFITOX - EMBRIONES <i>RHINELLA ARENARUM</i> (E25)															Sobrevida (%)
	TIEMPO DE EXPOSICIÓN															
	ANFIAGU					ANFICOR			ANFICRO							
	15-jul	16-jul	17-jul	18-jul	19-jul	20-jul	21-jul	22-jul	23-jul	24-jul	25-jul	26-jul	27-jul	28-jul	29-jul	
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h	240 h	264 h	288 h	312 h	336 h	
100	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7%
80	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7%
60	10	10	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12%
40	10	10	10	10	10	9	8	7	7	5	4	1	0	0	0	58%
Control	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9	9	9	8	8	8	91%

CUADRO 8- REGISTRO DE SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES DE *RHINELLA ARENARUM* A PARTIR DEL E25 CADA 24 HS PARA LA ESTACIÓN DE MONITOREO 2 DURANTE 336 (H)

ESTACIÓN DE MONITOREO 3 - CUENCA HÍDRICA ARROYO LAS CONCHITAS																
Concentración (%)	ANFITOX - EMBRIONES <i>RHINELLA ARENARUM</i> (E25)															Sobrevida (%)
	TIEMPO DE EXPOSICIÓN															
	ANFIAGU					ANFICOR			ANFICRO							
	15-jul	16-jul	17-jul	18-jul	19-jul	20-jul	21-jul	22-jul	23-jul	24-jul	25-jul	26-jul	27-jul	28-jul	29-jul	
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h	240 h	264 h	288 h	312 h	336 h	
100	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%
80	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%
60	10	8	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7%
40	10	10	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9%
Control	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9	9	9	8	8	8	91%

CUADRO 9- REGISTRO DE SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES DE *RHINELLA ARENARUM* A PARTIR DEL E25 CADA 24 HS PARA LA ESTACIÓN DE MONITOREO 3 DURANTE 336 (H)

ESTACIÓN DE MONITOREO 4 - CUENCA HÍDRICA ARROYO LAS CONCHITAS																
Concentración (%)	ANFITOX - EMBRIONES <i>RHINELLA ARENARUM</i> (E25)															Sobrevida (%)
	TIEMPO DE EXPOSICIÓN															
	ANFIAGU					ANFICOR			ANFICRO							
	15-jul	16-jul	17-jul	18-jul	19-jul	20-jul	21-jul	22-jul	23-jul	24-jul	25-jul	26-jul	27-jul	28-jul	29-jul	
0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h	240 h	264 h	288 h	312 h	336 h		
100	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%
80	10	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5%
60	10	9	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10%
40	10	10	8	8	8	7	7	6	5	3	2	1	1	1	1	49%
Control	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9	9	9	8	8	8	91%

CUADRO 10- REGISTRO DE SOBREVIDA DE EMBRIONES DE *RHINELLA ARENARUM* A PARTIR DEL E25 CADA 24 HS PARA LA ESTACIÓN DE MONITOREO 4 DURANTE 336 (H)

5.4 Curvas de sobrevivencia de embriones de *rhinella arenarum* a partir del E25

5.4.1 Estación de Monitoreo 1

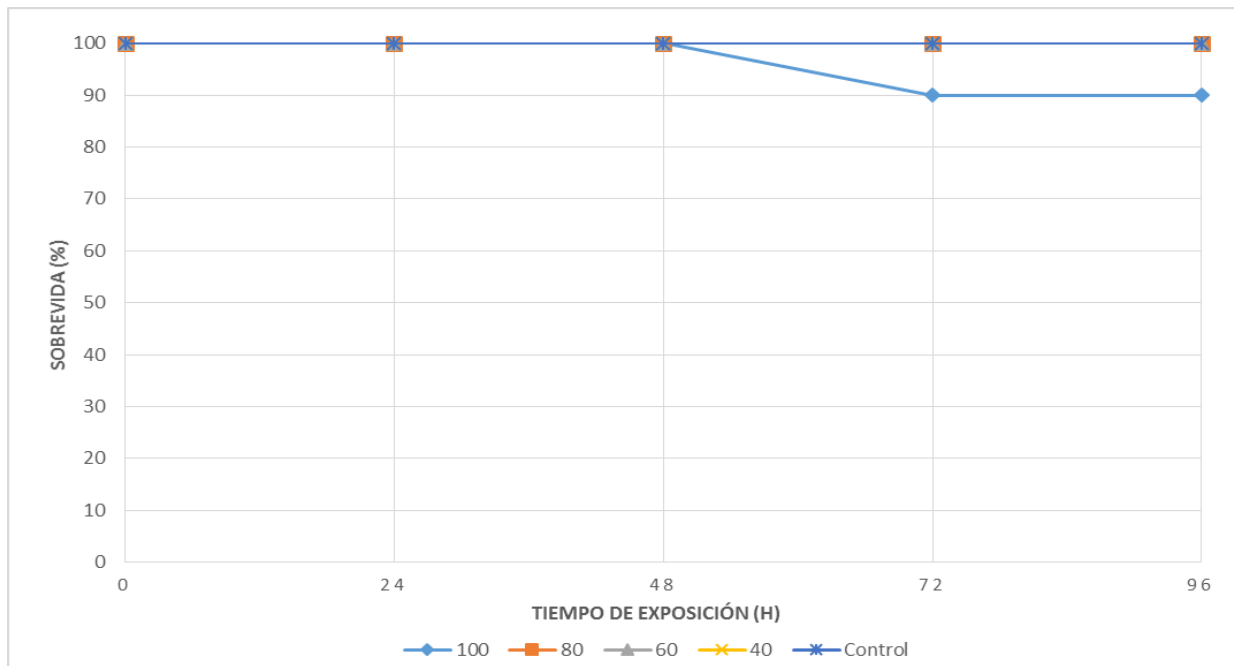


FIGURA 34- CURVAS DE SOBREVIDA DE EMBRIONES DE *RHINELLA ARENARUM* EXPUESTOS DE FORMA CONTINUA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MUESTRAS DEL ARROYO LAS CONCHITAS DURANTE 96 (H) PARA LA EM1-ANFIAGU.

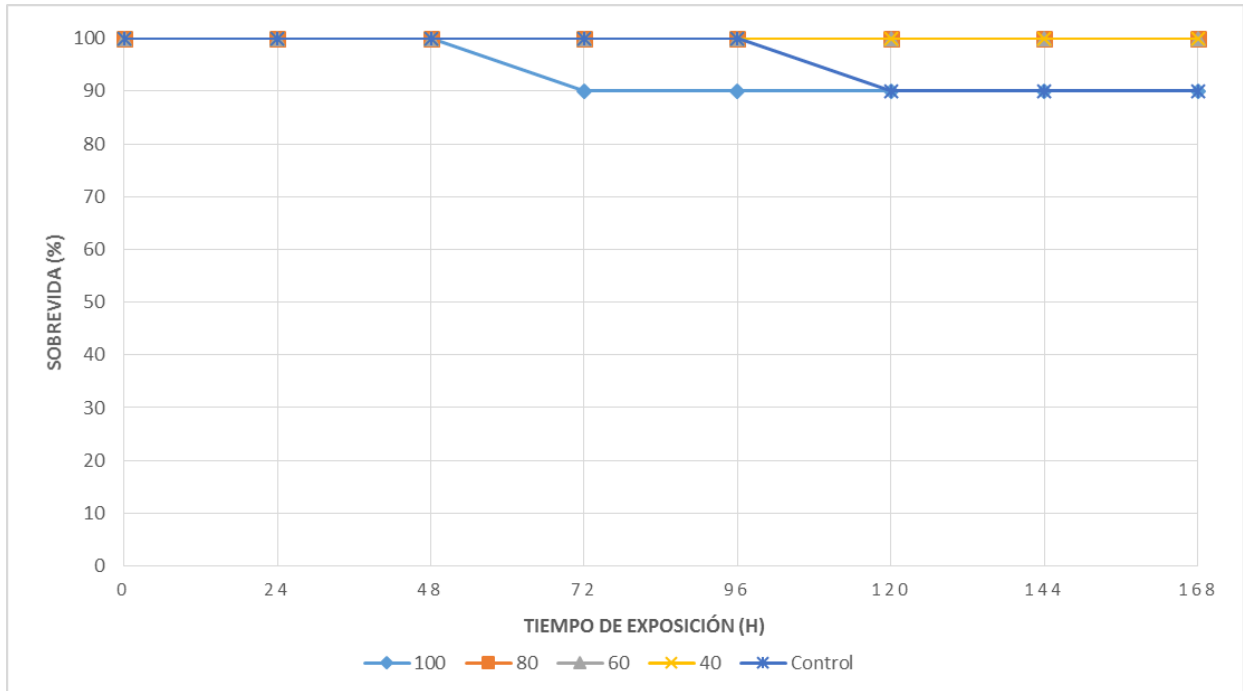


FIGURA 35- CURVAS DE SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES DE *RHINELLA ARENARUM* EXPUESTOS DE FORMA CONTINUA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MUESTRAS DEL ARROYO LAS CONCHITAS DURANTE 168 (H) PARA LA EM1- ANFICOR.

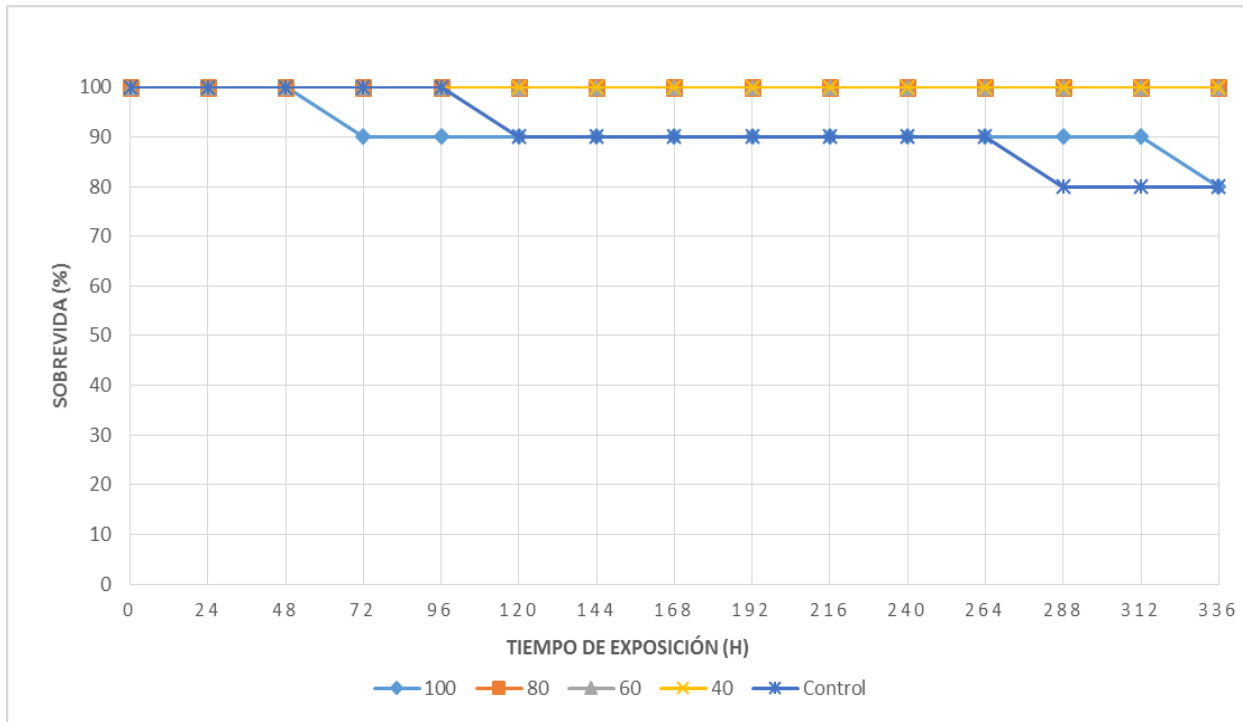


FIGURA 36- CURVAS DE SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES DE *RHINELLA ARENARUM* EXPUESTOS DE FORMA CONTINUA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MUESTRAS DEL ARROYO LAS CONCHITAS DURANTE 336 (H) PARA LA EM1-ANFICOR.

La Figura 34 muestra las curvas de sobrevivencia de los embriones de *Rhinella arenarum* a partir del E25 expuestos a distintas concentraciones con muestras del arroyo Las Conchitas y organismos de control. Esta figura no destaca un efecto letal significativo de la muestra extraída en la Estación de Monitoreo N°1 en un periodo de 96 h. Sin embargo, se observa un decaimiento del 10% en la sobrevivencia de los embriones expuesto al 100%.

La Figura 35, no refleja incremento de la toxicidad en los embriones expuestos al 100% durante la exposición crónica corta en el lapso de 168 h. Si se observa, decaimiento en el nivel de sobrevivencia no mayor al 10% en los organismos control.

La Figura 36, expresa un incremento de letalidad en los embriones expuestos al 100% con respecto a los tiempos de exposición de 96 h y 168 h. En los embriones expuestos al 40%, 60% y 80% con muestra ambiental del arroyo no se registraron letalidad en los periodos de tiempo 96 h, 168 h y 336 h.

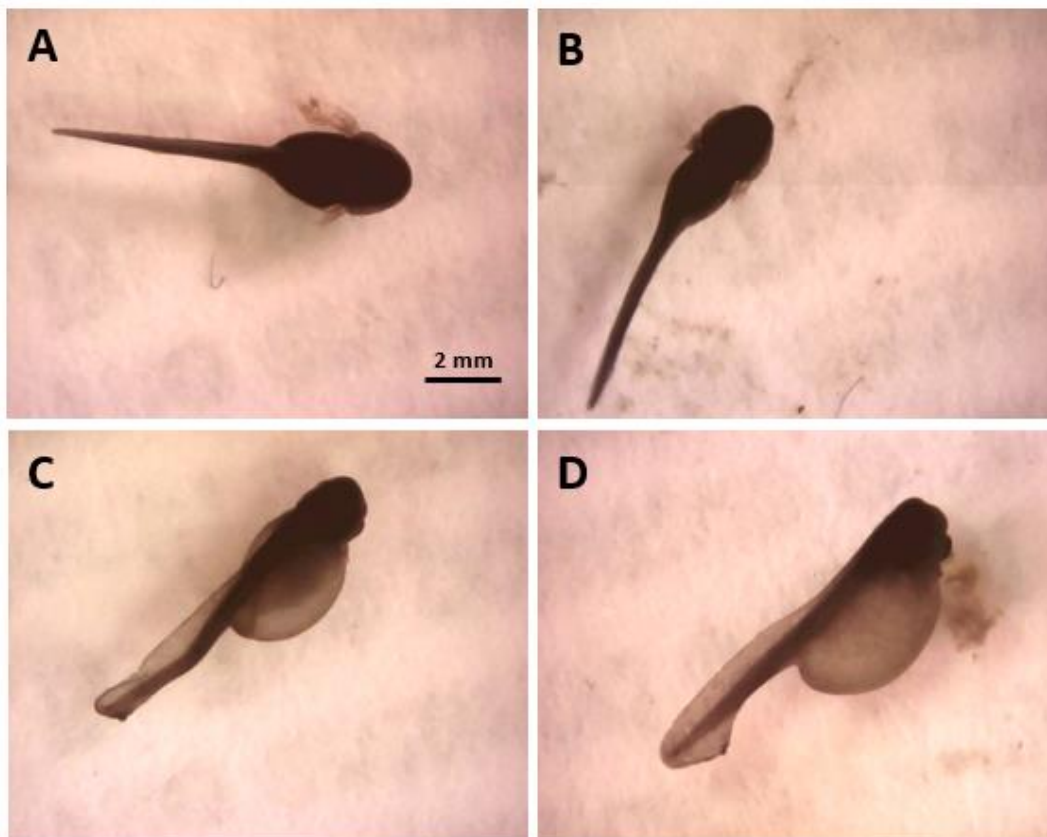


FIGURA 37- IMÁGENES DE MICROSCOPIA ESTEREOSCÓPICA DE EMBRIONES DE *RHINELLA ARENARUM* EXPUESTOS EN FORMA CONTINUA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MUESTRAS DE LA ESTACIÓN DE MONITOREO N°1 DEL ARROYO LAS CONCHITAS A PARTIR DEL ESTADIO DE OPÉRCULO COMPLETO (E25): (A) ORGANISMO CONTROL 96 (H); (B) 100% DE MUESTRA A 96 (H); (C) 100% DE MUESTRA A 168 (H), HIDROPESÍA, COLA ONDULADA; (D) 100% DE MUESTRA A 336 (H), HIDROPESÍA, COLA ONDULADA.

5.4.2 Estación de Monitoreo 2

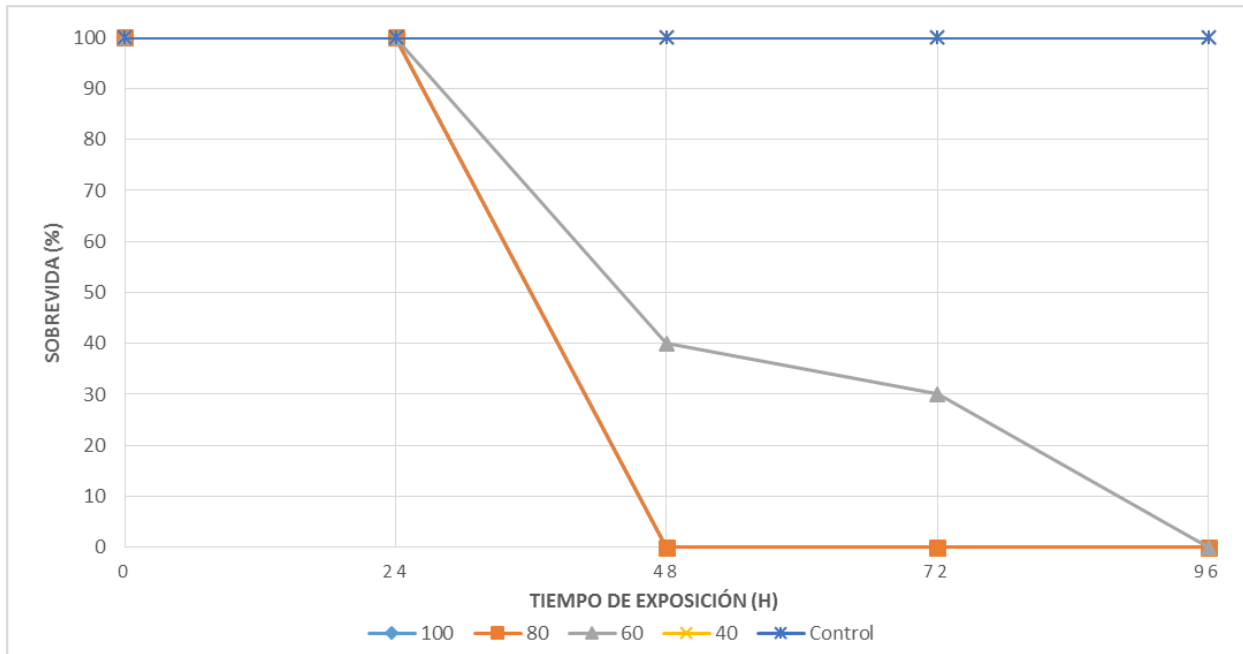


FIGURA 38- CURVAS DE SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES DE *RHINELLA ARENARUM* EXPUESTOS DE FORMA CONTINUA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MUESTRAS DEL ARROYO LAS CONCHITAS DURANTE 96 (H) PARA LA EM2- ANFIAGU.

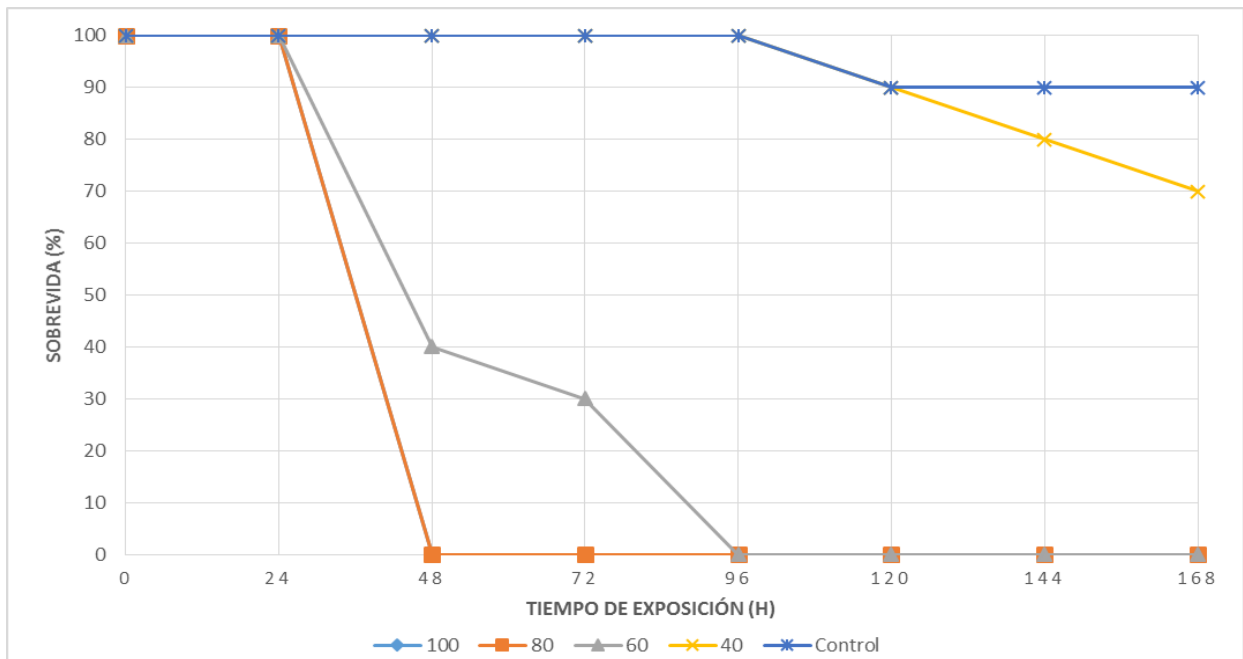


FIGURA 39- CURVAS DE SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES DE *RHINELLA ARENARUM* EXPUESTOS DE FORMA CONTINUA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MUESTRAS DEL ARROYO LAS CONCHITAS DURANTE 168 (H) PARA LA EM2- ANFICOR.

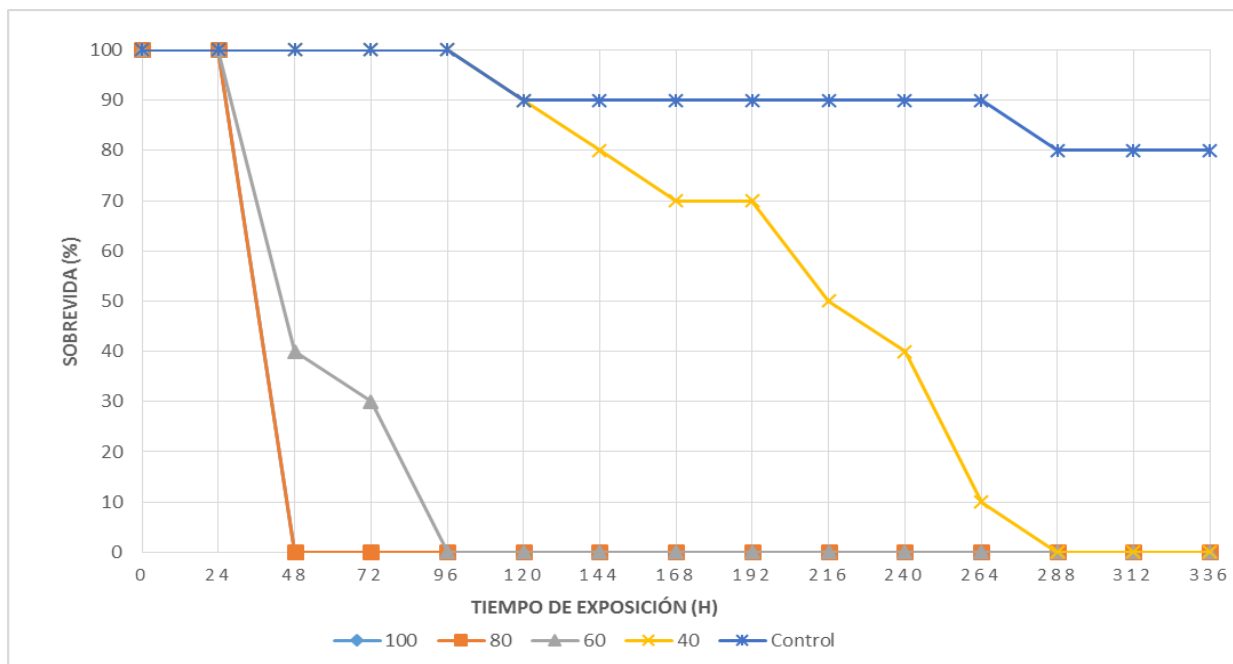


FIGURA 40- CURVAS DE SOBREVIDA DE EMBRIONES DE *RHINELLA ARENARUM* EXPUESTOS DE FORMA CONTINUA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MUESTRAS DEL ARROYO LAS CONCHITAS DURANTE 336 (H) PARA LA EM2- ANFICRO.

En la Figura 38, se puede observar que el porcentaje de sobrevivencia para las concentraciones al 100% y 80% es 0%, o sea, hubo una letalidad del 100% de los embriones de anfibios en tan solo 48 h. Para la concentración al 60%, el porcentaje de sobrevivencia 0% se registró a las 96 h pero con un decaimiento significativo de más del 50 % en los periodos de 48 h y 72 h. En cambio, en la concentración al 40% no se registró letalidad en el periodo de toxicidad aguda de 96 h.

La Figura 39, refleja como el porcentaje de sobrevivencia de la concentración al 40% comienza a disminuir. Llegando al 70% en un periodo de 168 h para la exposición crónica corta.

La Figura 40, confirma los datos de toxicidad anteriores y la muestra con concentración al 40% continua incrementando su toxicidad alcanzando un valor de sobrevivencia del 0% a las 288 h, en los ensayos de exposición crónica de 336 h. En los organismos control se registró una sobrevivencia del 80% en el periodo de toxicidad crónica de 336 h.

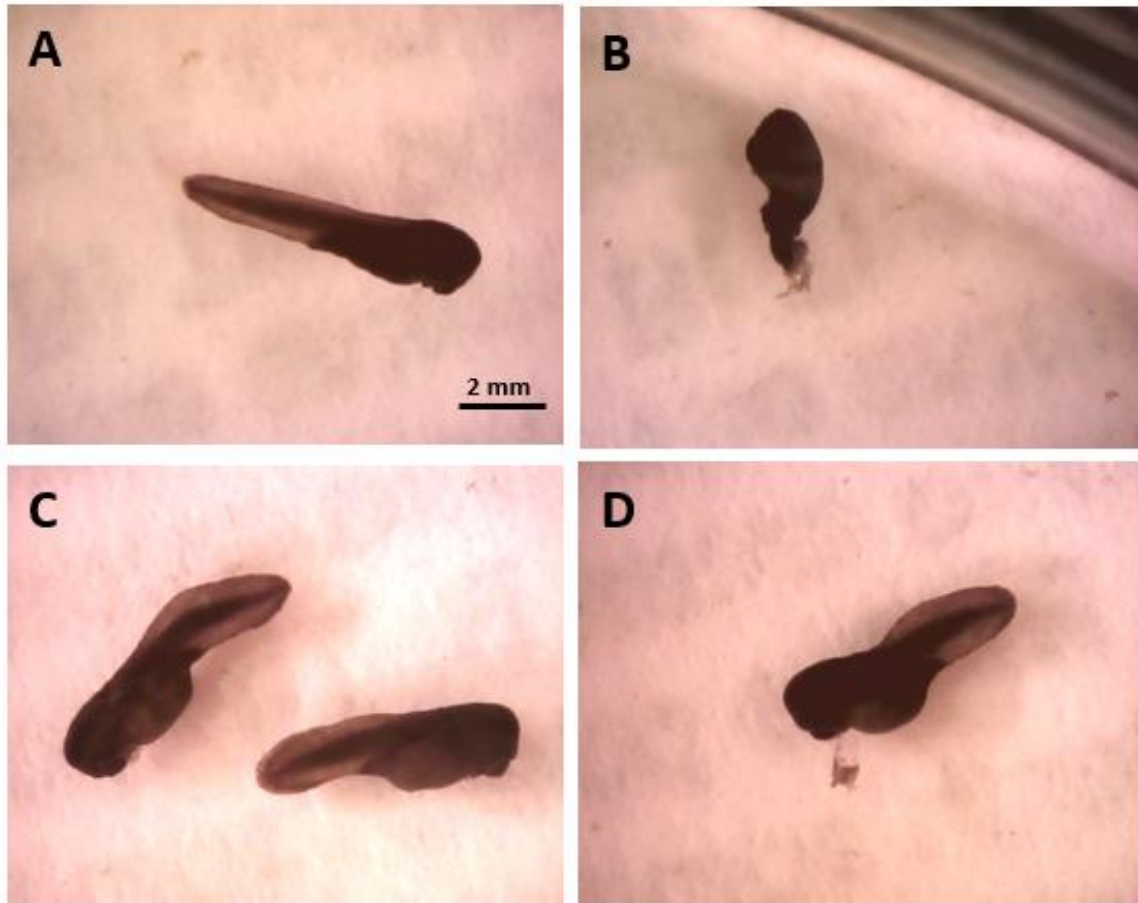


FIGURA 41- IMÁGENES DE MICROSCOPÍA ESTEREOSCÓPICA DE EMBRIONES DE *RHINELLA ARENARUM* EXPUESTOS EN FORMA CONTINUA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MUESTRAS DE LA ESTACIÓN DE MONITOREO N°2 DEL ARROYO LAS CONCHITAS A PARTIR DEL ESTADIO DE OPÉRCULO COMPLETO (E25): (A) ORGANISMO CONTROL 96 (H); (B) 100% DE MUESTRA A 96 (H), EMBRIÓN MUERTO; (C) 60% DE MUESTRA A 168 (H), HIDROPESÍA, INCURVACIÓN DORSAL DE LA COLA; (D) 40% DE MUESTRA A 240 (H), HIDROPESÍA, COLA ONDULADA, MICROCEFALIA.

5.4.3 Estación de Monitoreo 3

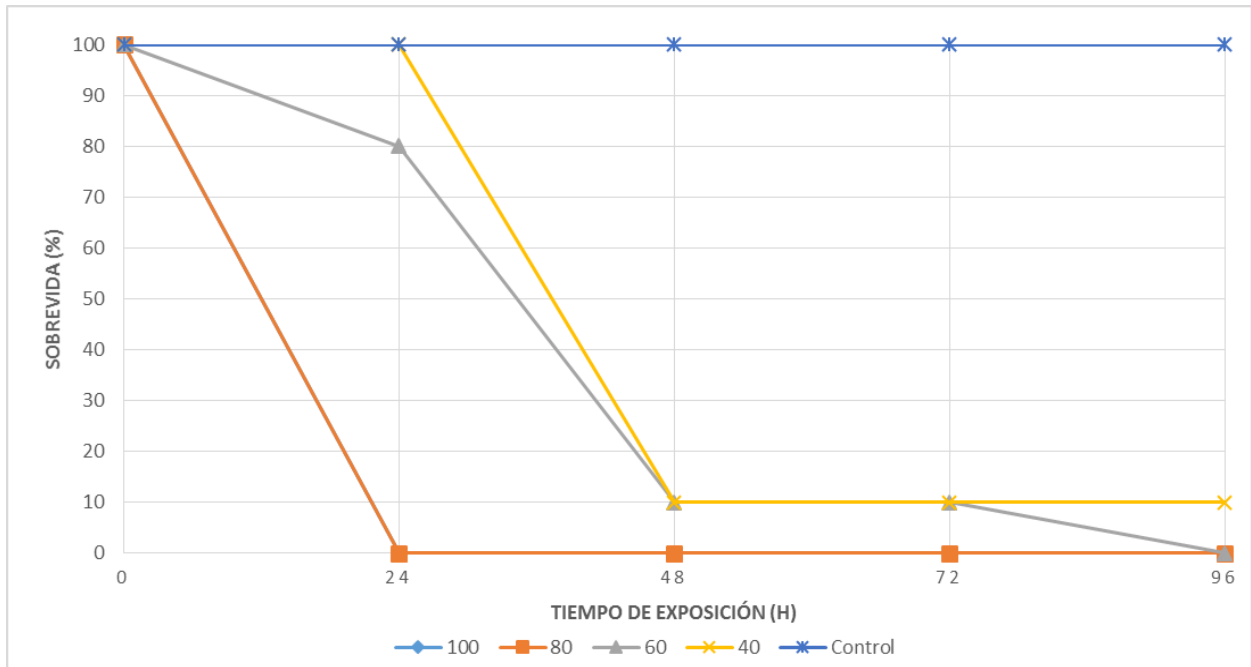


FIGURA 42- CURVAS DE SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES DE *RHINELLA ARENARUM* EXPUESTOS DE FORMA CONTINUA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MUESTRAS DEL ARROYO LAS CONCHITAS DURANTE 96 (H) PARA LA EM3- ANFIAGU.

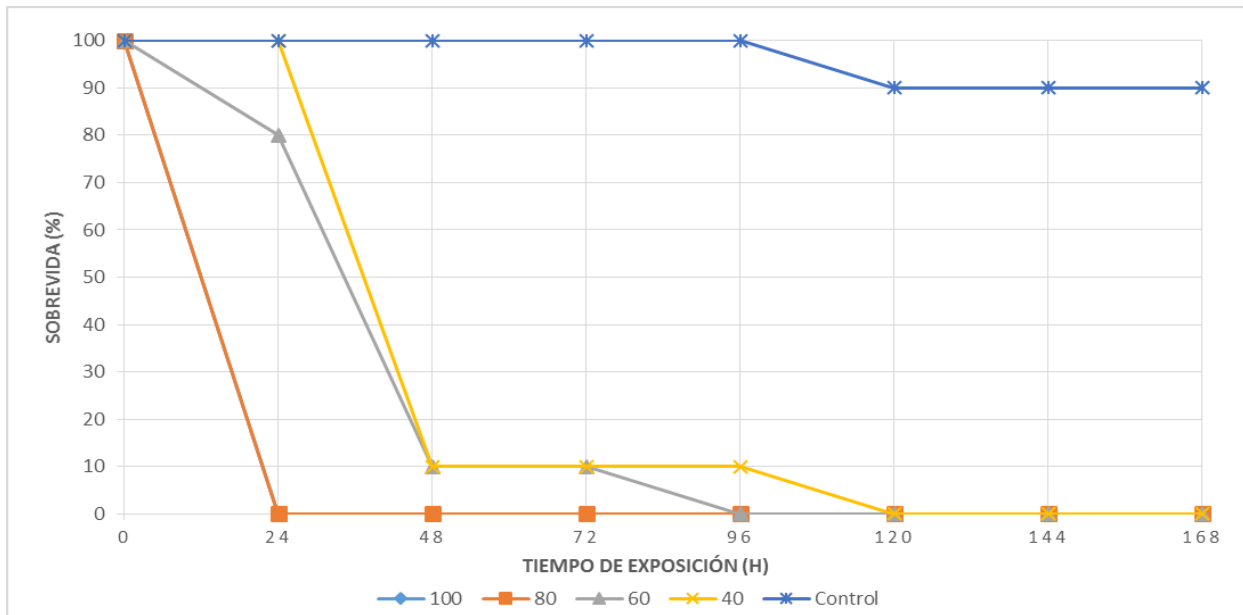


FIGURA 43- CURVAS DE SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES DE *RHINELLA ARENARUM* EXPUESTOS DE FORMA CONTINUA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MUESTRAS DEL ARROYO LAS CONCHITAS DURANTE 168 (H) PARA LA EM3- ANFICOR.

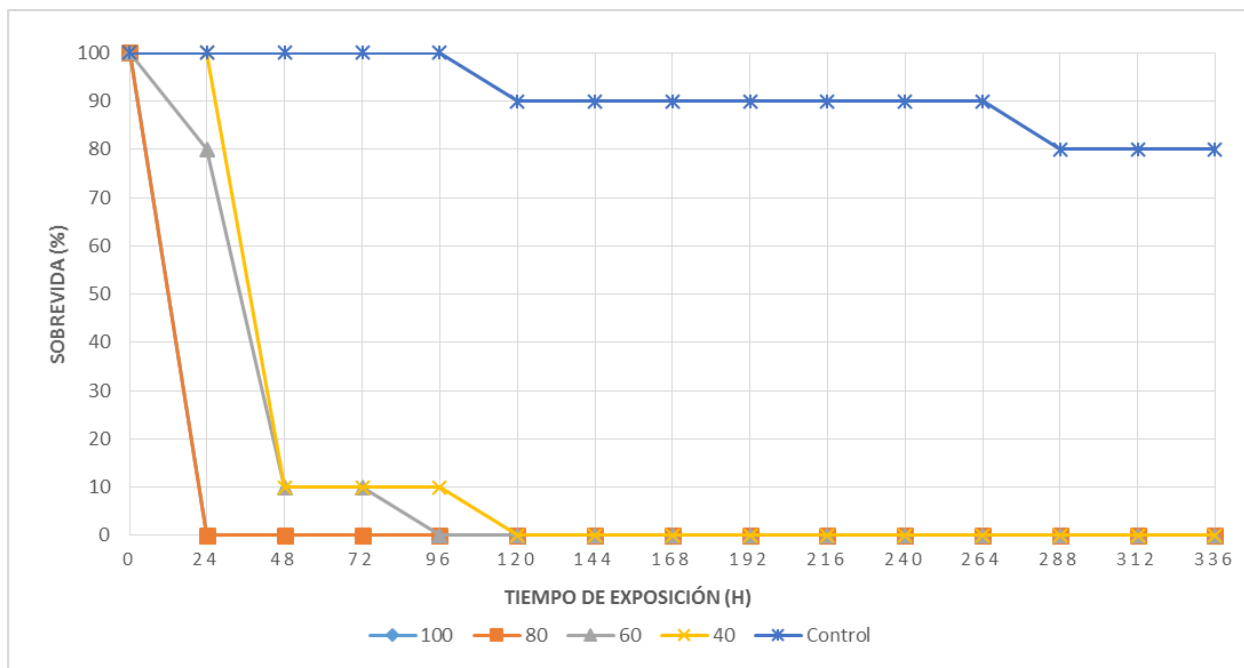


FIGURA 44- CURVAS DE SOBREVIDA DE EMBRIONES DE *RHINELLA ARENARUM* EXPUESTOS DE FORMA CONTINUA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MUESTRAS DEL ARROYO LAS CONCHITAS DURANTE 336 (H) PARA LA EM3- ANFICRO.

La Figura 42, refleja altos niveles de toxicidad superiores a los valores obtenidos en la Estación de Monitoreo N°2. Para las concentraciones al 100% y 80% se registró una sobrevida del 0% en tan solo 24 h. Las concentraciones al 60% y 40%, en cambio, alcanzaron el mismo valor de sobrevida en 48 h y 72 h para los ensayos de toxicidad aguada en 96 h.

En la Figura 43, los embriones expuestos a la concentración del 40% alcanzan el 100% de letalidad a las 120 h de exposición en los ensayos de toxicidad crónica corta de 168 h.

La Figura 44, ratifica el alto nivel de toxicidad de las Estación de Monitoreo N°3, con una letalidad del 100% en todas sus concentraciones en tan solo 120 h de exposición en los ensayos de toxicidad crónica de 336 h.

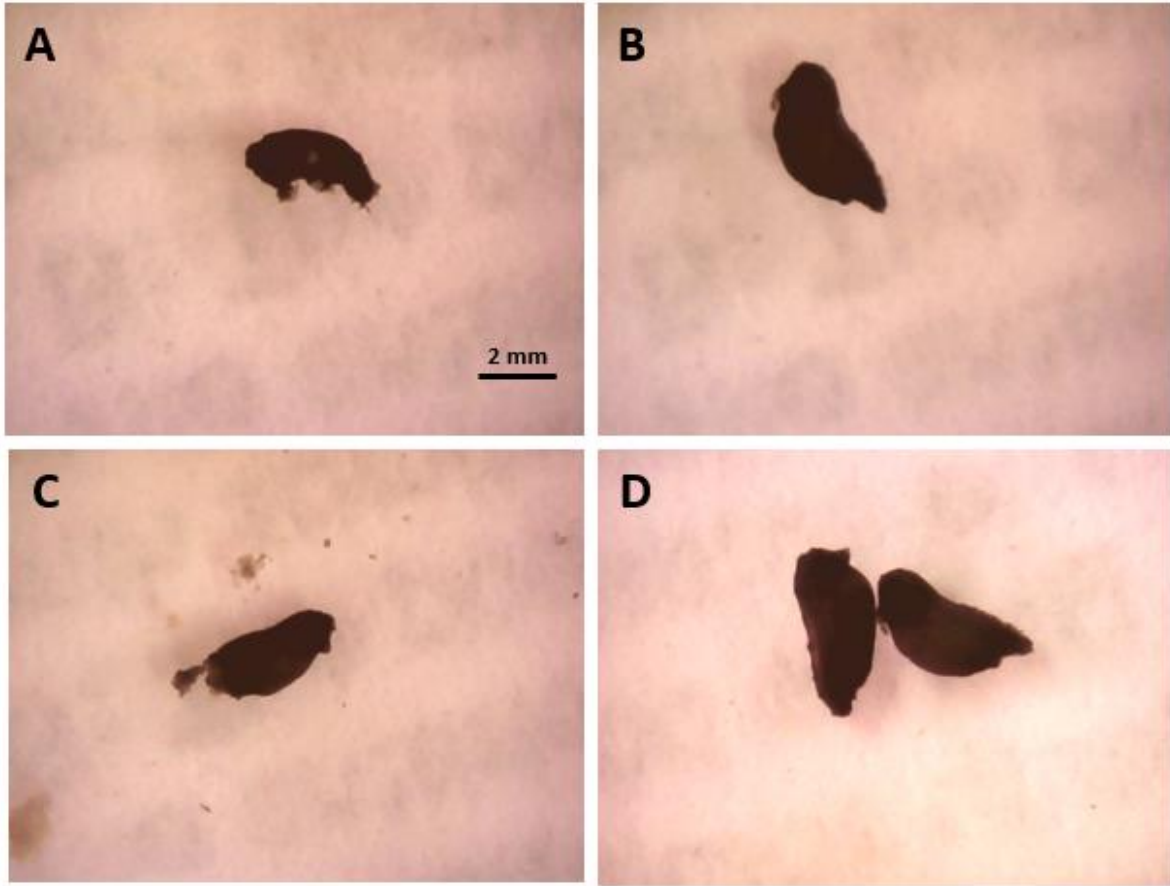


FIGURA 45- IMÁGENES DE MICROSCOPÍA ESTEREOSCÓPICA DE EMBRIONES DE *RHINELLA ARENARUM* EXPUESTOS EN FORMA CONTINUA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MUESTRAS DE LA ESTACIÓN DE MONITOREO N°3 DEL ARROYO LAS CONCHITAS A PARTIR DEL ESTADIO DE OPÉRCULO COMPLETO (E25): (A) EMBRIÓN EXPUESTO A CONCENTRACIÓN DEL 100% EN 24 H, INHIBICIÓN EN EL SUBDESARROLLO GENERAL, SIN VIDA; (B) EMBRIÓN EXPUESTO A CONCENTRACIÓN DEL 80% EN 24 H, SIN VIDA; (C) EMBRIÓN EXPUESTO AL 60% EN 96 H, SIN VIDA; (D) EMBRIÓN EXPUESTO AL 40% EN 120 H, SIN VIDA.

5.4.4 Estación de Monitoreo 4

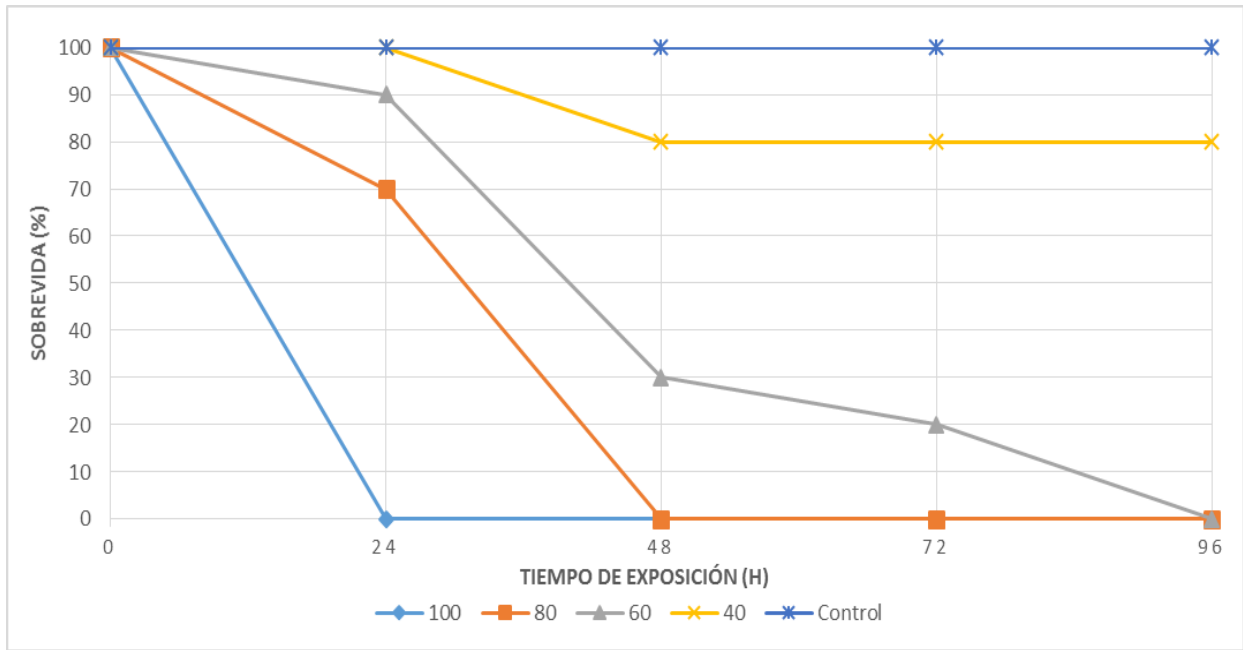


FIGURA 46- CURVAS DE SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES DE *RHINELLA ARENARUM* EXPUESTOS DE FORMA CONTINUA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MUESTRAS DEL ARROYO LAS CONCHITAS DURANTE 96 (H) PARA LA EM4- ANFIAGU.

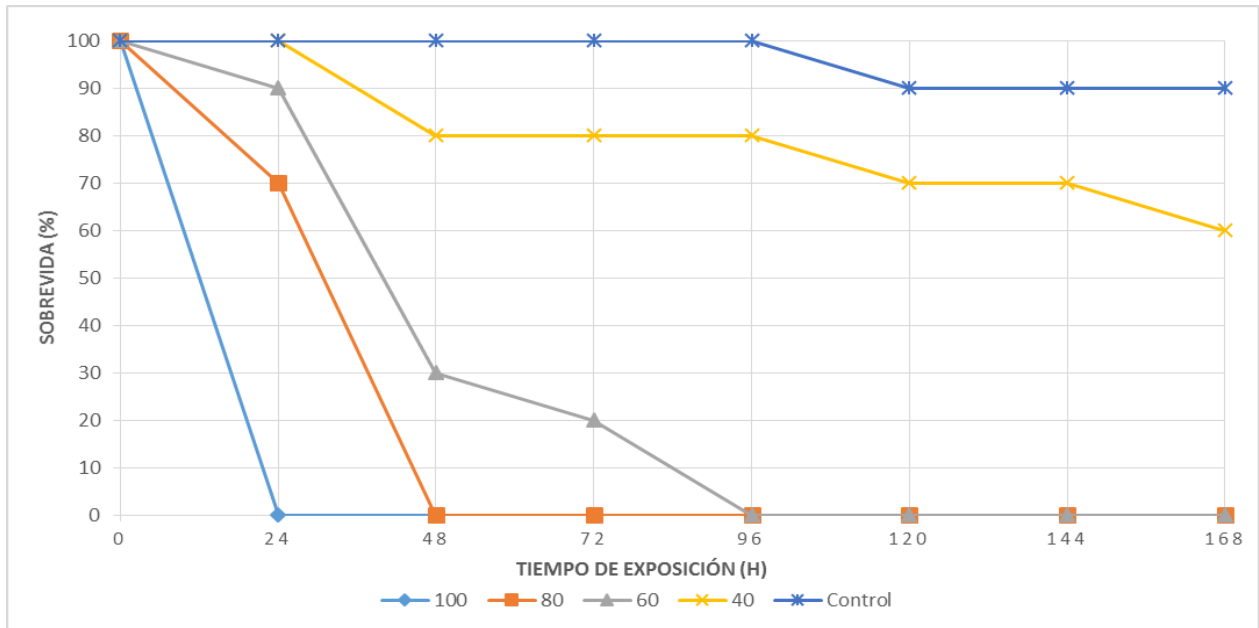


FIGURA 47- CURVAS DE SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES DE *RHINELLA ARENARUM* EXPUESTOS DE FORMA CONTINUA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MUESTRAS DEL ARROYO LAS CONCHITAS DURANTE 168 (H) PARA LA EM4- ANFICOR.

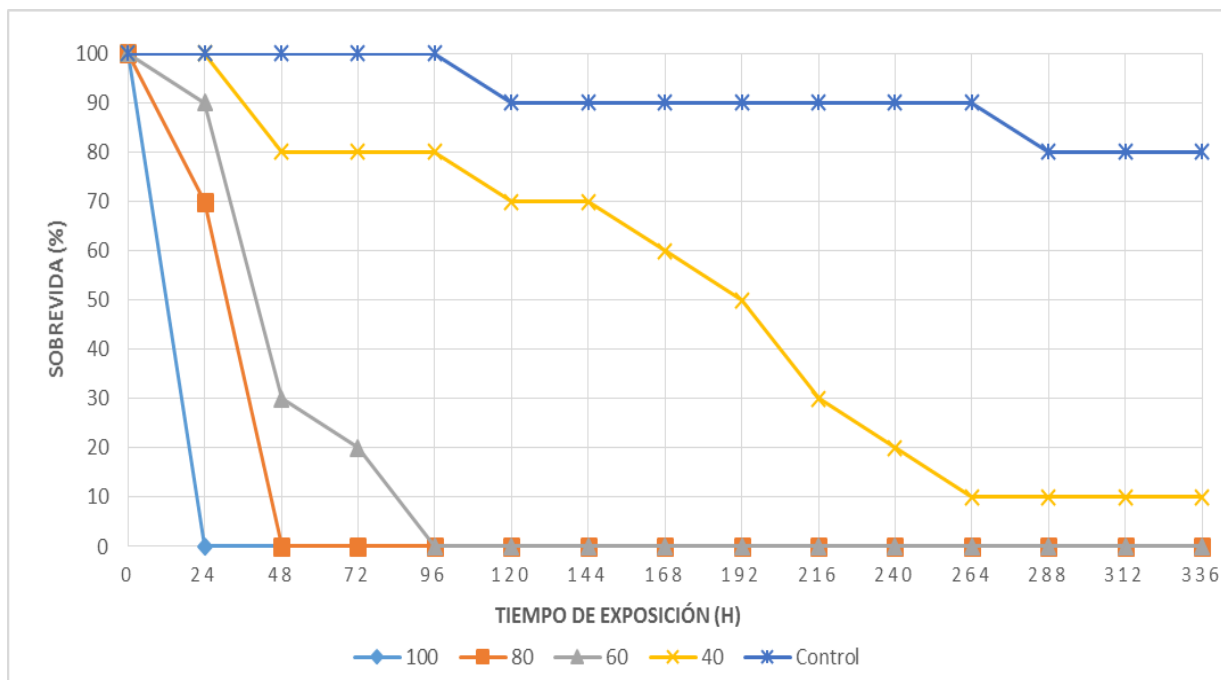


FIGURA 48- CURVAS DE SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES DE *RHINELLA ARENARUM* EXPUESTOS DE FORMA CONTINUA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MUESTRAS DEL ARROYO LAS CONCHITAS DURANTE 336 (H) PARA LA EM4- ANFICRO.

La Figura 46, presenta para la concentración al 100%; sobrevivencia 0% en 24 h, para la concentración al 80%; sobrevivencia 0% en 48 h, para la concentración al 60%; sobrevivencia 0% a 96 h, y para la concentración al 40%; sobrevivencia del 80%, para el test de toxicidad aguda de 96 h.

La Figura 47, con letalidad del 100% en las concentraciones al 100%, 80% y 60% en tan solo 96 h. Allí se puede observar un decaimiento del 20% en el nivel de sobrevivencia de los embriones expuestos a una concentración del 40% en el test de toxicidad crónica corta de 168 h.

Y en la Figura 48, se observa un constante decaimiento en el nivel de sobrevivencia de la muestra expuesta a una concentración del 40%, llegando al 10% de embriones vivos y manteniéndose en ese nivel hasta finalizar el test de toxicidad crónica de 336 h.

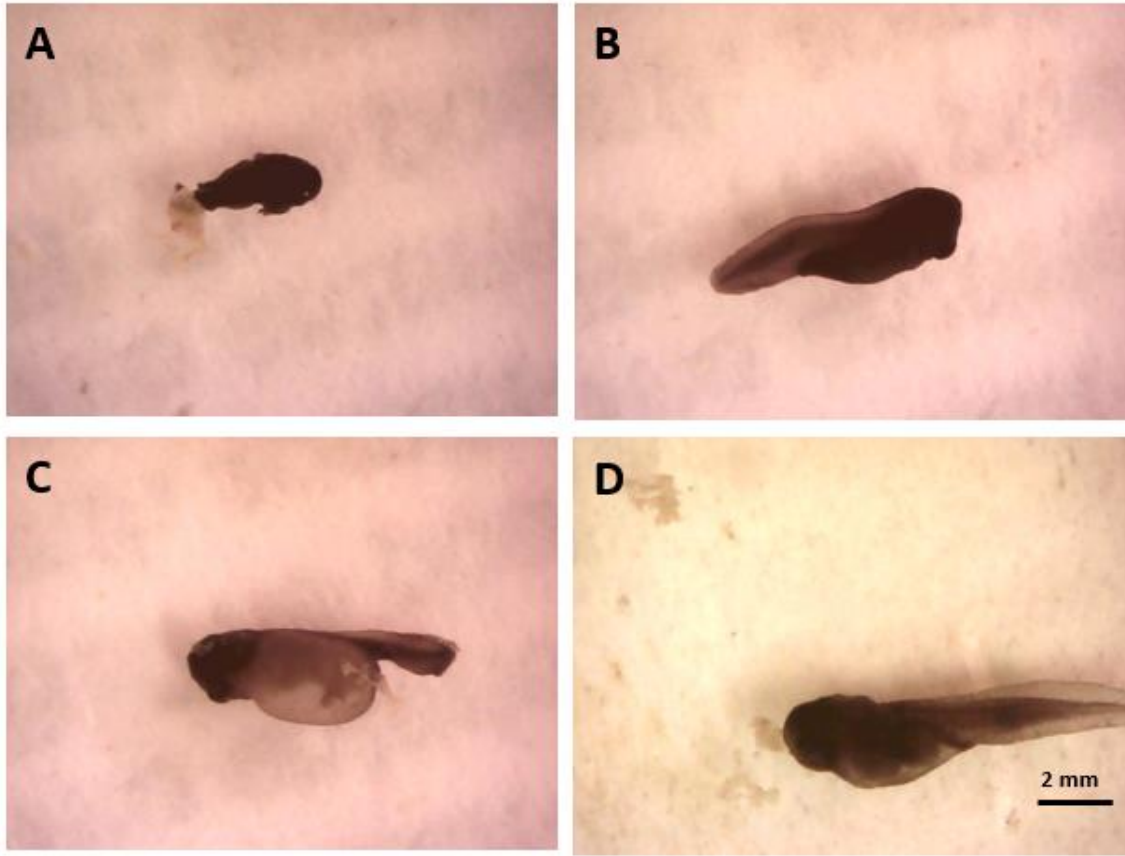


FIGURA 49- IMÁGENES DE MICROSCOPIA ESTEREOSCÓPICA DE EMBRIONES DE *RHINELLA ARENARUM* EXPUESTOS EN FORMA CONTINUA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MUESTRAS DE LA ESTACIÓN DE MONITOREO N°4 DEL ARROYO LAS CONCHITAS A PARTIR DEL ESTADIO DE OPÉRCULO COMPLETO (E25): (A) EMBRIÓN EXPUESTO A CONCENTRACIÓN DEL 100% EN 24 H, SIN VIDA; (B) EMBRIÓN EXPUESTO A CONCENTRACIÓN DEL 80% EN 24 H, HIDROPESÍA, INCURVACIÓN DORSAL DE LA COLA; (C) EMBRIÓN EXPUESTO AL 60% EN 72 H, MARCADA HIDROPESÍA; (D) EMBRIÓN EXPUESTO AL 40% EN 144 H, HIDROPESÍA, SUBDESARROLLO GENERAL, MICROCEFALIA.

5.5 Comparación de las curvas de sobrevivencia de las estaciones de monitoreo para las mismas concentraciones

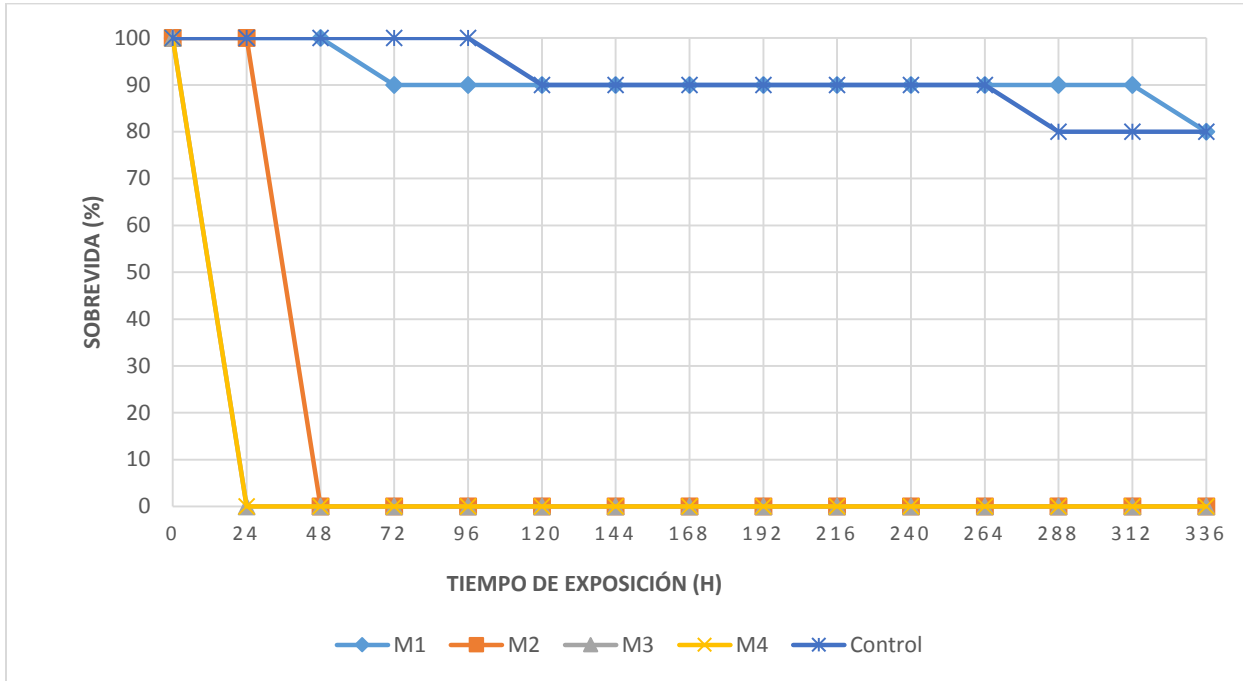


FIGURA 50- EMBRIONES DE *RHINELLA ARENARUM* (E25) EXPUESTOS AL 100% CON MUESTRA AMBIENTAL

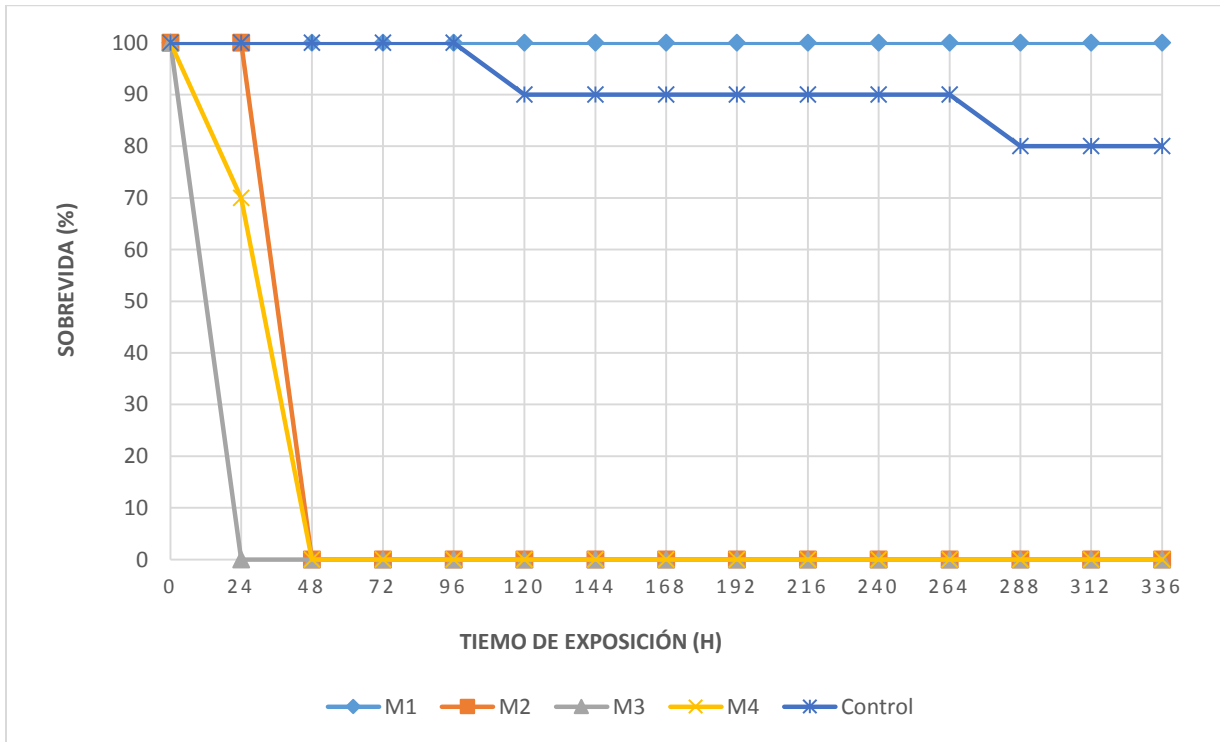


FIGURA 51- EMBRIONES DE *RHINELLA ARENARUM* (E25) EXPUESTOS AL 80% CON MUESTRA AMBIENTAL

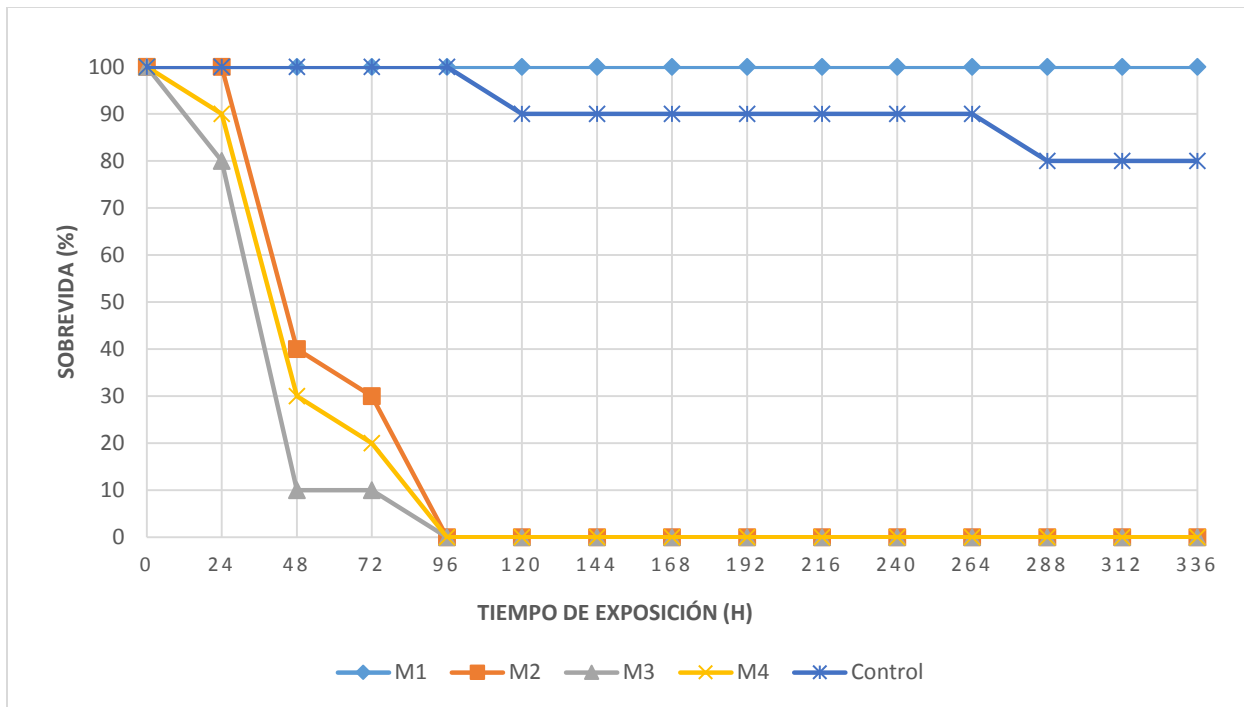


FIGURA 52- EMBRIONES DE *RHINELLA ARENARUM* (E25) EXPUESTOS AL 60% CON MUESTRA AMBIENTAL

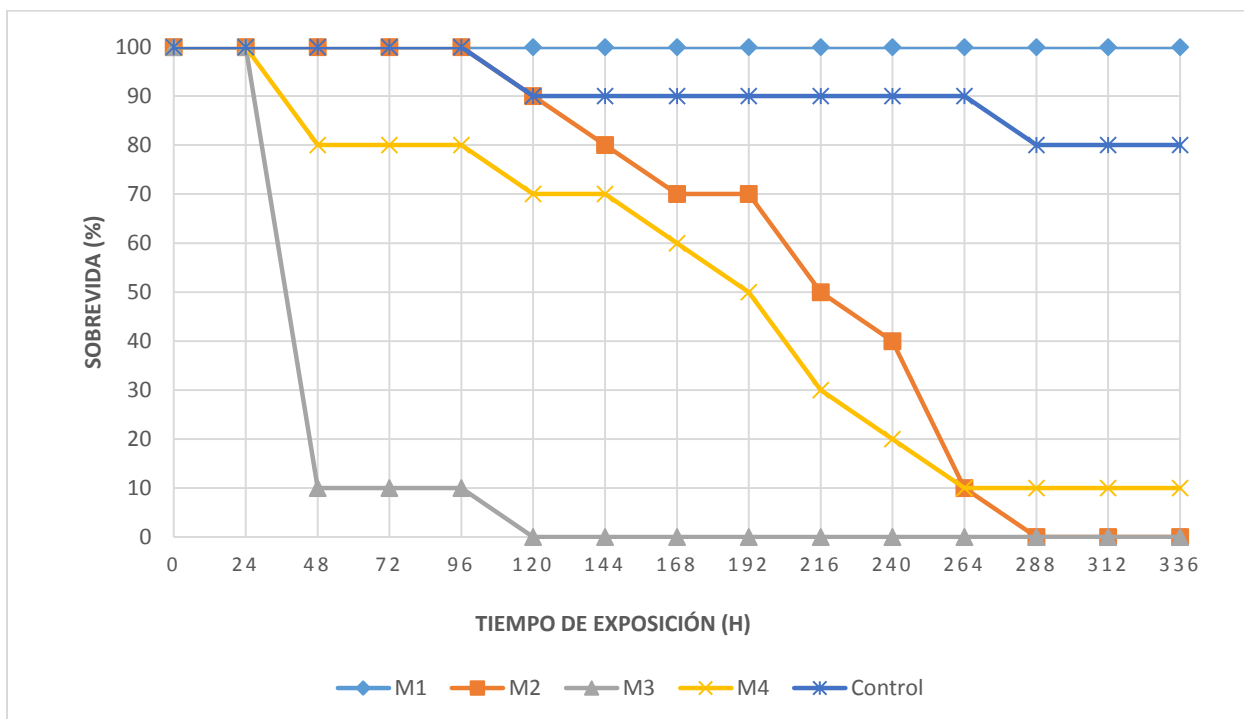


FIGURA 53- EMBRIONES DE *RHINELLA ARENARUM* (E25) EXPUESTOS AL 40% CON MUESTRA AMBIENTAL

5.6 Resultados ANFITOX

A partir de los registros y curvas de sobrevida obtenidos con embriones de anfibio *rhinella arenarum* analizados con muestra de agua superficial de las 4 (cuatro) estaciones de monitoreo del arroyo Las Conchitas, los resultados toxicidad se expresaron en Unidades de Toxicidad Crónica y Unidades de Toxicidad Aguda. Los resultados obtenidos fueron:

ESTACIÓN DE MONITOREO	NOEC 168 h (%)	UTcc 168 h	NOEC 336 h (%)	UTc 336 h
M1	100	1,0	100	1,0
M2	40	> 2,5	40	> 2,5
M3	40	> 2,5	40	> 2,5
M4	40	> 2,5	40	> 2,5

CUADRO 11- UNIDADES DE TOXICIDAD CRÓNICO CORTO Y TOXICIDAD CRÓNICO (UTCC; UTC)

ESTACIÓN DE MONITOREO	CL 50 96 h (%)	UTa 96 h
M1	0	< 0.3
M2	60	2
M3	40	3
M4	60	2

CUADRO 12- UNIDADES DE TOXICIDAD AGUDA (UTA)

De todas las estaciones relevadas; la Estación de Monitoreo N°1 correspondiente al Parque Ecológico Cultural Guillermo Hudson no presentó toxicidad. Para el periodo de exposición aguda no se registró toxicidad siendo el valor expresado en UTA < 0.3 (valor límite máximo para ese tiempo de exposición) y en los de toxicidad crónica registró un valor de 1, esto significa que tampoco existe toxicidad.

Para la Estación de Monitoreo N°2, el valor de UTA es de 2; esto significa que como mínimo estaría 6 (seis) veces por encima del límite para toxicidad aguda. Con respecto a la UTc, el valor fue mayor a 2,5. Si bien no se registró un valor exacto para la toxicidad crónica, siendo la aguda 6 (seis) veces mayor que la admisible, la crónica normalmente registra una toxicidad mayor que la obtenida en el ensayo agudo.

Con respecto a la Estación de Monitoreo N°3, se registró un valor para la UTA igual a 3; encontrándose como mínimo 10 (diez) veces por encima del límite para toxicidad agua. Siendo este el valor el más alto para este periodo de exposición detectado en las cuatro estaciones de

monitoreo. Para las UTc, se registró un valor mayor a 2,5. La situación es igual a la informada para la Estación de Muestreo N°2.

Y por último, en la Estación de Monitoreo N°4 se registró un valor de 2 para las UTa, lo que significa más 6 (seis) veces por encima del límite para toxicidad aguda. Finalmente para las UTc se registró un valor mayor a 2,5. Siendo su situación similar a la informada para las estaciones de monitoreo anteriores.

CAPÍTULO 6:
BIOENSAYOS DE TOXICIDAD,
DISEÑO EXPERIMENTAL II:
EMBRIONES DE PECES

6-1 Materiales y métodos generales

6-1.1 Obtención del material biológico vertebrado II – *danio rerio*

Los embriones de *danio rerio*, pueden ser obtenidos y criados rápidamente en gran número con métodos sencillos en laboratorio. Esta especie de pez puede ser utilizada durante 1 año a 1,5 años luego de los 6 meses de vida. Además de ser uno de los peces más estudiados, entre las ventajas del pez *danio rerio* están su potencial reproductivo de entre 100 y 200 huevos por hembra (500-600 μ de diámetro por huevo), su fecundación y desarrollo externos que en 48 horas da lugar a un nuevo pez, sus embriones transparentes, su pequeño tamaño (4-5 cm) que permite mantener 25 peces en unos 45 litros de agua y su corto tiempo de madurez sexual (5-6 meses).

En este estudio se utilizó un método sencillo para reproducir huevos embrionados de pez *danio rerio* (Rocha, Ruiz, & Coll, 2002). El desarrollo de este método constó en utilizar dos acuarios de 60 L, uno con hembras y el otro con machos. Previamente se seleccionaron entre 5 o 6 ejemplares adultos de cada sexo y se aislaron dentro de sus respectivos acuarios por medio de una maya de polietileno a fin de que la distribución de oxígeno y temperatura sea uniforme para todos los peces en el recinto.

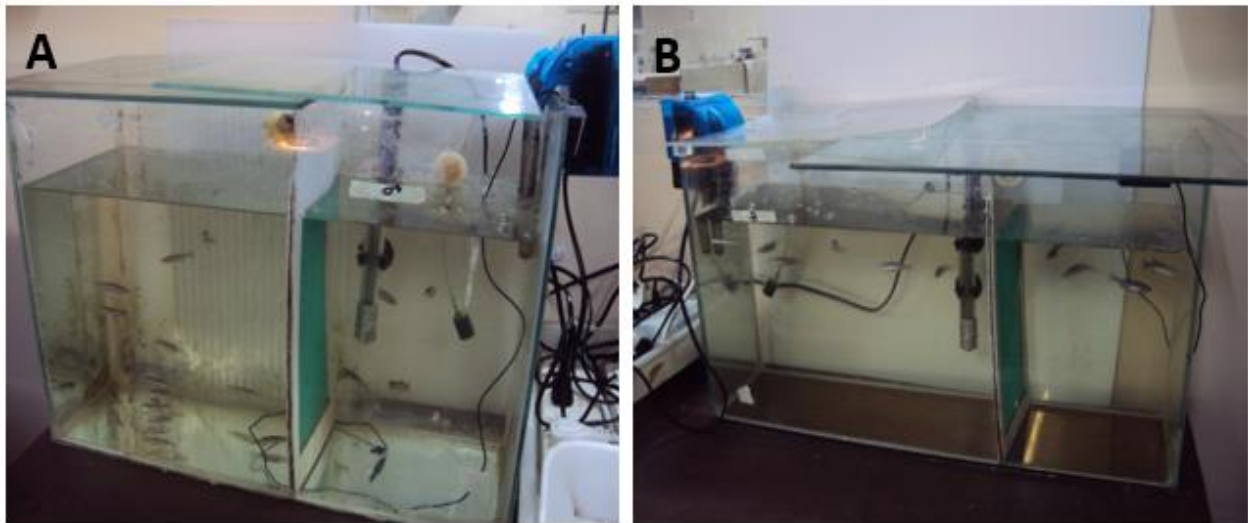


ILUSTRACIÓN 9- (A) EJEMPLARES MACHOS DE *DANIO RERIO* AISLADOS; (B) EJEMPLARES HEMBRAS DE *DANIO RERIO* AISLADOS. EN AMBOS ACUARIOS SE SEPARARON DENTRO DEL MISMO ALGUNOS EJEMPLARES PARA SER UTILIZADOS EN LA REPRODUCCIÓN

Se instaló un difusor conectado a un equipo adquirido comercialmente para aireación suplementaria en acuarios, junto con este también se incorporó un termostato de temperatura y un filtro de agua para mantener las condiciones óptimas del acuario. Conductividad, pH y temperatura fueron los parámetros que se monitorearon de forma continua dentro del acuario. Se sobrealimento

a los peces los días previos a la reproducción pero no se les dio de comer antes de colocarlos en los tanques de desove.

Todos los tanques, recirculadores, termostatazadores, mangueras y piedras difusoras de oxígeno fueron higienizados con agua caliente y luego enjuagados con agua destilada. 48 horas antes de iniciar el proceso de reproducción, los tanques donde se realizó el desove se puso en funcionamiento a fin de estabilizar el sistema.

Los tanques, fueron llenados en un 75% de su capacidad total con una mezcla de 60% de agua desclorada (12 litros) y 40% de agua desionizada (8 litros). La conductancia fue de unos 300 a 400 microsiemes. La temperatura ideal para la puesta se encuentra entre 24° y 26°C. Alrededor de las 19 horas del 3 de julio del 2019 se dio inicio al proceso de ovulación del pez *danio rerio*, colocando 2 hembras y 4 machos en cada tanque. Para inducir la puesta, la iluminación artificial se mantuvo por encima de los acuarios con ciclos de 14 horas de iluminación y 10 horas de oscuridad mediante dos lámparas en un espacio cerrado y con temperatura controlada mediante equipo de aire acondicionado frio-calor.

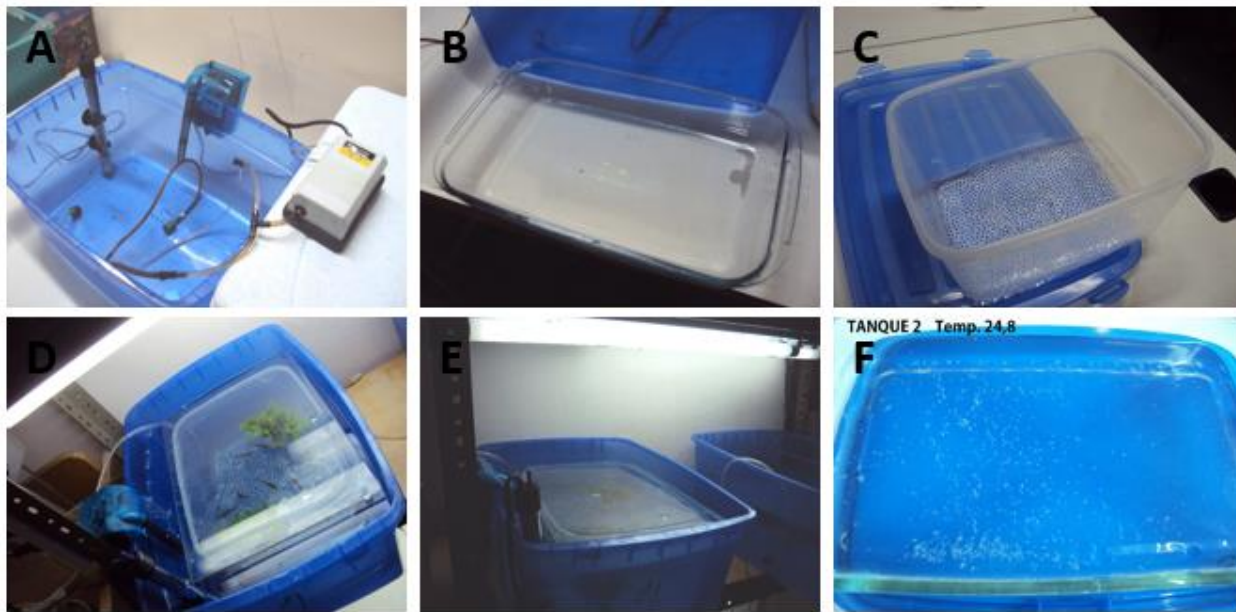


ILUSTRACIÓN 10- PROCESO DE REPRODUCCIÓN Y DESOVE DE *DANIO RERIO*. (A) TANQUE N°1 CON TERMOSTATO, DIFUSOR Y FILTRO; (B) BANDEJA DE VIDRIO UTILIZADA COMO CONTENCIÓN; (C) RECIPIENTE PLÁSTICO CON ORIFICIOS EN PARTE INFERIOR A FIN DE PERMITIR EL PASO DE LOS HUEVOS; (D) TANQUE EN RECIRCULACIÓN CON EJEMPLARES MACHOS Y HEMBRAS; (E) PROCESO DE ILUMINACIÓN ARTIFICIAL; (F) DESOVE DE HUEVOS

Una vez concretado el desove, con mucho cuidado se separaron los huevos con una pipeta de vidrio y se juntaron en un vaso de precipitados. Se enjuagaron dos veces con solución de Zebratox (SZ) con una gota de azul de metileno diluido, para luego suspenderlos solo en solución de Zebratox. Dado que los huevos son pesados, sedimentan rápidamente por lo cual es fácil separar los sobrenadantes por vertido supervisando mediante lupa y luz el procedimiento.

Composición SZ: Cloruro de Sodio (NaCl) 117 mg/L, Cloruro de Potasio (KCl) 5,2 mg/L, Cloruro de Calcio (CaCl₂) 31,6 mg/L, Sulfato de Magnesio (MgSO₄) 33,3 mg/L disueltos en agua destilada, asegurando la disponibilidad de oxígeno (Herkovits, Pérez-Coll, & Herkovits, 2002).



ILUSTRACIÓN 11- SOLUCIÓN DE ZEBRATOX PRODUCIDA EN LABORATORIO Y CONTENIDA EN ENVASE DE 40 L

Una vez efectuados estos lavados se colocaron todos los huevos en una fuente de vidrio transparente y con luz de perfil y fondo azul, mediante lupa se separaron los huevos “blancos” (“coagulados” = muertos, no fecundados) de los “transparentes” (vivos fecundados). Una vez efectuada la primera separación, los huevos fecundados se colocaron en un vaso de precipitado con unos 150 ml de SZ y se mantuvieron en estufa a 28°C hasta el día siguiente. Al otro día, se repite nuevamente el procedimiento de separar los huevos muertos de los vivos. Se colocan en placas de Petri con SZ los huevos fecundados hasta su utilización en los bioensayos.



ILUSTRACIÓN 12- (A) SEPARACIÓN DEL MATERIAL SOBRENADANTE FINALIZADO EL DESOVE; (B) SEPARACIÓN DE HUEVOS BLANCOS (COAGULADOS=MUERTOS) DE LOS HUEVOS VIVOS; (C) HUEVOS PREVIO REPOSO EN ESTUFA; (D) REPOSO EN ESTUFA A 28°C PARA POSTERIOR UTILIZACIÓN EN BIOENSAYOS

6-1.2 Criterio de aceptación del material biológico

La calidad y fertilidad de los huevos fueron inspeccionadas, considerando aceptable una tasa de fecundación mayor que el 75% y más de un 70% de sobrevivencia de embriones normales al alcanzar el estadio de 18 h (18-SOMITE) (Kimmel, Ballard, Kimmel, Ullmann, & Schilling, 1995).

6-1.3 Bioensayos de toxicidad

Para el desarrollo del diseño experimental con embriones de *danio rerio* se determinó aplicar diluciones volumen/volumen (v/v) de muestra ambiental al: 20% ^{v/v}; 40% ^{v/v}; 60% ^{v/v}; 80% ^{v/v}; 100% ^{v/v}). Por ejemplo: se tomaron 20 mL de muestra y se llevó a volumen final en un matraz de 100 mL con solución ZEBRATOX (SZ). Estos rangos de las diluciones en los bioensayos permitieron estimar las distintas concentraciones letales a fin de obtener las curvas de toxicidad de la muestra ambiental a diferentes tiempos de exposición.

Básicamente, se realizó el siguiente diseño experimental:

- 1) Exposición continua a partir del desarrollo embrionario (18-somite) en distintos periodos de tiempo: test agudo (ZEBRAGU) de 96 h de exposición, un test crónico corto (ZEBRACOR) de 168 h (7 días) de exposición y un test crónico (ZEBRACRO) de 336 h

(14 días) (Herkovits & Perez-Coll, 1999). De acuerdo a (USEPA, 1991) tratamientos crónicos en organismos de vida libre se consideran a partir de 7 días de exposición.

Con los datos provenientes de cada de test individual se construirán las curvas concentración-respuesta para la mortalidad (pudiéndose también registrar algunos efectos subletales como ser; retraso en el desarrollo, incurvaciones en el eje, ausencia de la aleta ventral de la cola, etc.).

Los test ZEBRATOX propuestos tienen como condiciones generales:

- 2) La exposición de los embriones es continua a través del test y la renovación de las soluciones es diaria, o cada 48 hs en los test crónicos cortos, crónicos o con estadíos tempranos de desarrollo.
- 3) Para cada muestra y duplicado se utilizaron cámaras con 10 embriones en (18-SOMITE), cada una con 10 ml de solución MUESTRA/ZEBRATOX dependiendo de la dilución; los controles también se realizan de igual manera.
- 4) Los embriones deben ser asignados a las cámaras al azar, al igual que la disposición espacial de las cámaras.
- 5) A fin de evaluar la toxicidad sobre el desarrollo embrionario se registrarán en tablas la información correspondiente a la sobrevivencia.

6.1.3.1 Test agudo (ZEBRAGU)

Para la realización de este test se propone la utilización de embriones de *danio rerio* en el estadío de desarrollo (18-SOMITE). Si bien los test agudos pueden realizarse por tiempo menores (24, 48, 72 horas), los efectos tóxicos de determinadas sustancias, formulados, efluentes y ciertas muestras de aguas superficiales y subterráneas se expresan recién después del cuarto día de exposición. Considerando que los estándares internacionales reconocen como agudo los test hasta las 96 horas de tratamiento, corresponde informar sobre todo en caso de obtenerse efecto tóxico antes, los resultados a las 96 h de exposición registrando los resultados parciales a las 24, 48 y 72 horas de exposición (USEPA, 1988).

6.1.3.2 Test crónico corto (ZEBRACOR)

Para la realización de este test se propone la utilización de embriones de *danio rerio* en el estadío de desarrollo (18-SOMITE). Si bien el período organogénico en esta etapa del desarrollo está culminando y no es recomendable para evaluar efectos teratogénicos (malformaciones), las

susceptibilidad a las sustancias tóxicas continua siendo elevada y se puede homologar a un test de estadíos tempranos de desarrollo en el que se evalúa solamente sobrevida durante 7 (siete) días.

6.1.3.3 Test crónico (ZEBRACRO)

Este test utiliza embriones de *danio rerio* en el estadío de desarrollo (18-SOMITE), con exposición del tóxico por más de 10 días. Se recomienda la evaluación de los efectos sobre la sobrevida de los embriones durante 14 días informando la mortalidad en forma parcial cada 24 horas de tratamiento.

Este test permite evaluar muestras de baja toxicidad como por ejemplo, aguas subterráneas y cuerpos receptores en puntos alejados en los sitios de descarga de efluentes.

6-1.4 Condiciones de los bioensayos

Los bioensayos de toxicidad se realizaron según el método ZEBRATOX siendo este una adaptación para los embriones de *danio rerio* del método estandarizado ANFITOX (Herkovits & Perez-Coll, 1999). Se colocaron 10 embriones en estadío 18-SOMITE en cápsulas de Petri de 4 cm de diámetro tapadas, formando cámaras, con 10 mL de muestra ambiental diluida en ZEBRATOX. Para cada muestra se realizó en simultáneo un duplicado bajo las mismas condiciones e individuos control en SZ. Los ensayos fueron semiestáticos con renovación de las soluciones cada 24 hs. Con cada cambio de solución, se realizó una revisión en microscopio óptico a fin de observar malformaciones, retrasos madurativos y retirar los individuos muertos. El cambio de estas solución se hizo por medio de succión con una pipeta lo más rápidamente posible pero evitando succionar o dañar los embriones. Si existe mucho material orgánico proveniente de la desintegración de los embriones se podrá reemplazar la cámara test.

Durante todo el desarrollo del test, la temperatura se mantuvo estable en 28°C con estufa. Las eventuales variaciones en la temperatura de muy corta duración no afectan los resultados de los test. Las altas o bajas temperaturas pueden incrementar las malformaciones y/o mortalidad ya que representan un estrés adicional al tóxico evaluado (Pérez Coll, Herkovits, & Salibián, 1986). Por ello se mantuvo un ambiente con temperatura controlada por medio de un equipo de aire acondicionado frio-calor durante todo el desarrollo del estudio. El pH de las soluciones, normalmente de 6.6-7.5 fue medido al comenzar el test y cada 24 hs hasta finalizar el mismo. En caso de que los valores de pH estén por fuera de los de referencia habrá que acondicionar una

condición con pH neutralizado. Las variaciones en el pH también pueden modificar los resultados de los test.

6-1.5 Registro y análisis de los datos

La sobrevida de los embriones se registró en tablas y los embriones muertos fueron extraídos cada 24 h al renovarse el medio, a fin de evitar la contaminación por microorganismos. Este registro se hizo durante las 336 h que duró el ensayo. La muerte se diagnosticó por pérdida de la integridad, ausencia de movimiento ciliar mientras y por ausencia de latido cardíaco.

La inhibición del crecimiento es otro indicador muy sensible de toxicidad durante el desarrollo embrionario y es relativamente para cuantificar. El desarrollo del crecimiento embrionario fue observado bajo microscopio estereoscópico binocular (ZEISS Stemi DV4), y fotografiado con una cámara digital Sony DSC-90. La sobrevida fue registrada diariamente hasta los 14 días de exposición. Los datos fueron transformados en Unidades de Toxicidad aguda ($UT_a = 100/LC50$) y Unidades de Toxicidad crónica ($UT_c = 100/NOEC$).

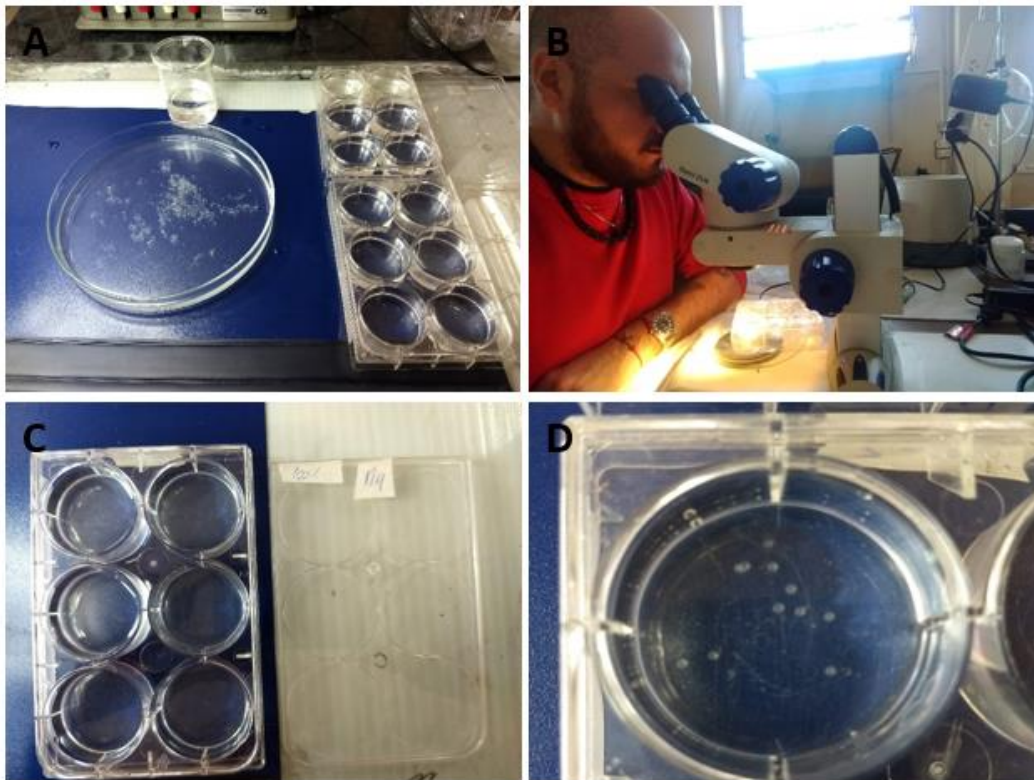


ILUSTRACIÓN 13- PROCESO DE REVISIÓN Y SELECCIÓN DE EMBRIONES *DANIO RERIO*. (A) SELECCIÓN DE EMBRIONES Y TRASPASO A PLACAS DE PETRI; (B) REVISIÓN DE EMBRIONES DE *DANIO RERIO* EN MICROSCOPIO; (C) PREPARACIÓN DE LAS PLACAS DE PETRI; (D) EMBRIONES DE *DANIO RERIO* EN MUESTRA DILUIDA CON SOLUCIÓN DE ZEBRATOX

6.2 Toxicidad del arroyo sobre el desarrollo embrionario del *danio rerio*

6.2.1 Preparación de las diluciones de exposición

Los bioensayos de toxicidad se realizaron utilizando diluciones volumen/volumen (v/v) de muestra ambiental sobre solución de ZEBRATOX (SZ). Se prepararon diluciones al 20% ^{v/v}; 40% ^{v/v}; 60% ^{v/v}; 80% ^{v/v} y 100% ^{v/v} para cada estación de monitoreo. En paralelo para cada dilución se realizó un duplicado y controles con solución ZEBRATOX (SZ). Las soluciones se analizaron a diario a fin de comprobar su estabilidad en el tiempo.

Por ejemplo para la Estación de Monitoreo (EM1): se tomaron 6 mL de muestra y se llevó a volumen final en un tubo de ensayo de 10 mL con SZ (Muestra al 60 % ^{v/v}). Esta metodología fue empleada para el resto de las diluciones. Los rangos de las diluciones en los ensayos fueron necesarios para estimar las distintas diluciones letales a fin de obtener las curvas de toxicidad de la muestra a diferentes tiempos de exposición

6.2.2 Bioensayos de toxicidad

Para cada estación de monitoreo se realizaron los siguientes ensayos:

- Concentración al 100 % ^{v/v}: Se colocaron 10 embriones de *danio rerio* en estadio 18-SOMITE en una placa de Petri de 4 cm de diámetro con 10 mL de MUESTRA al 100 %. Simultáneamente se realizó un duplicado y mantuvieron individuos control en SZ.
- Concentración al 80 % ^{v/v}: Se colocaron 10 embriones de *danio rerio* en estadio 18-SOMITE en una placa de Petri de 4 cm de diámetro con 10 mL de MUESTRA al 80 %. Simultáneamente se realizó un duplicado y mantuvieron individuos control en SZ.
- Concentración al 60 % ^{v/v}: Se colocaron 10 embriones de *danio rerio* en estadio 18-SOMITE en una placa de Petri de 4 cm de diámetro con 10 mL de MUESTRA al 60 %. Simultáneamente se realizó un duplicado y mantuvieron individuos control en SZ.
- Concentración al 40 % ^{v/v}: Se colocaron 10 embriones de *danio rerio* en estadio 18-SOMITE en una placa de Petri de 4 cm de diámetro con 10 mL de MUESTRA al 40 %. Simultáneamente se realizó un duplicado y mantuvieron individuos control en SZ.
- Concentración al 20 % ^{v/v}: Se colocaron 10 embriones de *danio rerio* en estadio 18-SOMITE en una placa de Petri de 4 cm de diámetro con 10 mL de MUESTRA al 20 %. Simultáneamente se realizó un duplicado y mantuvieron individuos control en SZ.

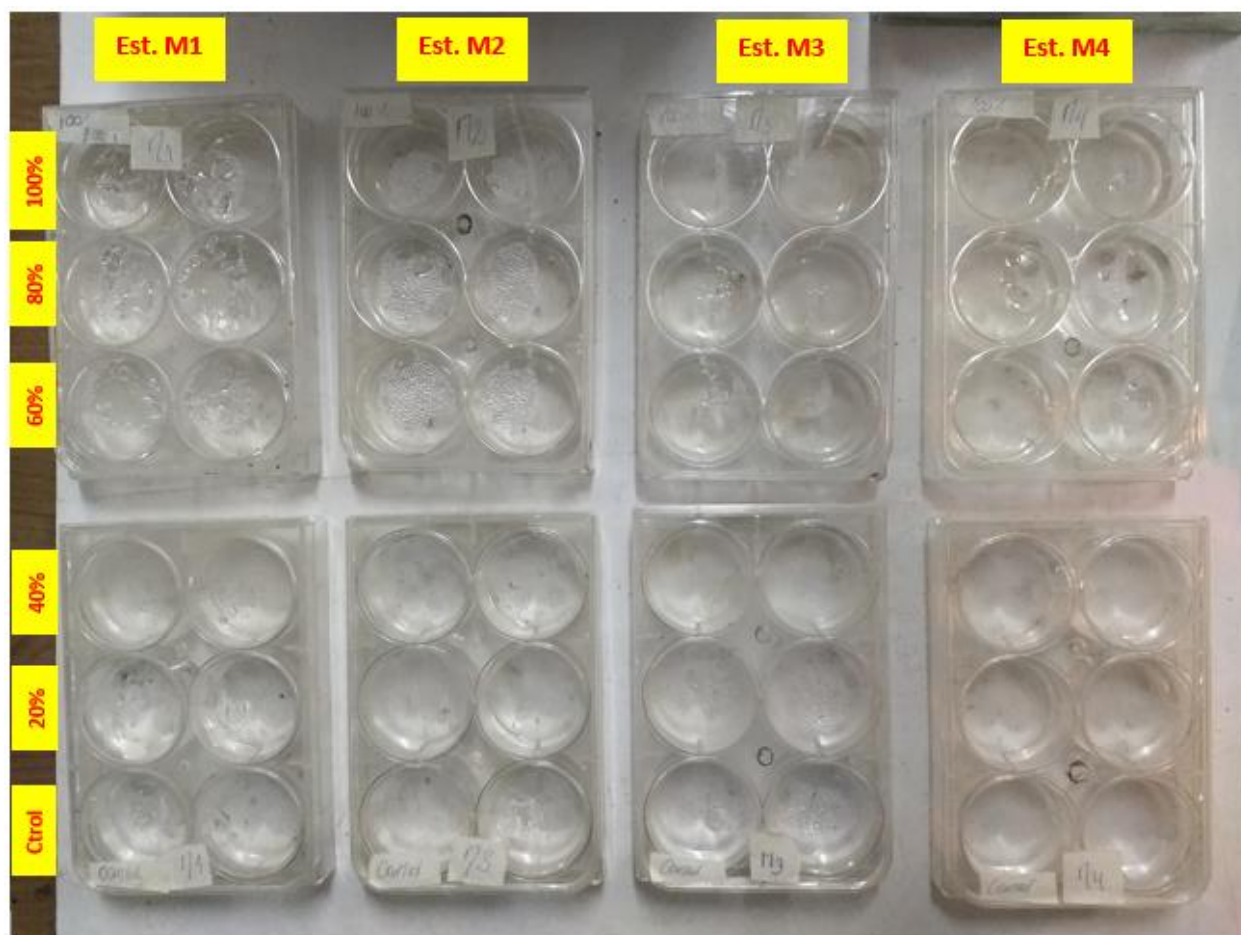


ILUSTRACIÓN 14- COLUMNA IZQUIERDA: DILUCIONES UTILIZADAS; FILA SUPERIOR: MUESTRAS DE LAS DISTINTAS ESTACIONES DE MONITOREO DEL ARROYO LAS CONCHITAS Y CONTROLES

6.3 Registro de sobrevida de embriones *danio rerio* a partir del 18 - SOMITE cada 24 (h)

ESTACIÓN DE MONITOREO 1 - CUENCA HÍDRICA ARROYO LAS CONCHITAS																
Concentración (%)	ZEBRATOX - EMBRIONES <i>DANIO RERIO</i> (E18-SOMITE)															Sobrevida (%)
	TIEMPO DE EXPOSICIÓN															
	ZEBRAGU					ZEBRACOR			ZEBRACRO							
	05-jul	06-jul	07-jul	08-jul	09-jul	10-jul	11-jul	12-jul	13-jul	14-jul	15-jul	16-jul	17-jul	18-jul	19-jul	
0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h	240 h	264 h	288 h	312 h	336 h		
100	20	19	19	19	19	19	19	19	19	18	18	16	16	16	16	90%
80	20	19	19	19	19	19	18	18	18	17	17	17	17	16	16	89%
60	20	20	19	19	18	18	18	18	18	18	18	16	16	14	14	87%
40	20	20	20	20	20	19	19	19	19	19	19	19	16	15	13	92%
20	20	20	20	20	20	19	18	18	18	17	17	16	15	14	13	88%
Control	20	19	19	19	19	19	19	19	19	19	18	18	17	17	17	92%

CUADRO 13- REGISTRO DE SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES DE *DANIO RERIO* A PARTIR DEL E18-SOMITE CADA 24 HS PARA LA ESTACIÓN DE MONITOREO 1 DURANTE 336 (h)

ESTACIÓN DE MONITOREO 2 - CUENCA HÍDRICA ARROYO LAS CONCHITAS																
Concentración (%)	ZEBRATOX - EMBRIONES <i>DANIO RERIO</i> (E18-SOMITE)															Sobrevida (%)
	TIEMPO DE EXPOSICIÓN															
	ZEBRAGU					ZEBRACOR			ZEBRACRO							
	05-jul	06-jul	07-jul	08-jul	09-jul	10-jul	11-jul	12-jul	13-jul	14-jul	15-jul	16-jul	17-jul	18-jul	19-jul	
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h	240 h	264 h	288 h	312 h	336 h	
100	20	20	18	15	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19%
80	20	20	20	8	4	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	21%
60	20	20	19	18	16	16	16	15	15	14	14	14	14	14	14	78%
40	20	20	18	18	18	18	18	18	18	18	17	17	17	17	15	88%
20	20	20	17	17	17	16	16	16	15	15	14	14	14	14	13	78%
Control	20	19	19	19	19	19	19	19	19	19	18	18	17	17	17	92%

CUADRO 14- REGISTRO DE SOBREVIDA DE EMBRIONES DE *DANIO RERIO* A PARTIR DEL E18-SOMITE CADA 24 HS PARA LA ESTACIÓN DE MONITOREO 2 DURANTE 336 (H)

ESTACIÓN DE MONITOREO 3 - CUENCA HÍDRICA ARROYO LAS CONCHITAS																
Concentración (%)	ZEBRATOX - EMBRIONES <i>DANIO RERIO</i> (E18-SOMITE)															Sobrevida (%)
	TIEMPO DE EXPOSICIÓN															
	ZEBRAGU					ZEBRACOR			ZEBRACRO							
	05-jul	06-jul	07-jul	08-jul	09-jul	10-jul	11-jul	12-jul	13-jul	14-jul	15-jul	16-jul	17-jul	18-jul	19-jul	
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h	240 h	264 h	288 h	312 h	336 h	
100	20	18	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10%
80	20	18	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11%
60	20	20	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14%
40	20	19	18	17	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25%
20	20	19	18	18	18	10	9	9	8	8	8	7	7	6	6	54%
Control	20	19	19	19	19	19	19	19	19	19	18	18	17	17	17	92%

CUADRO 15- REGISTRO DE SOBREVIDA DE EMBRIONES DE *DANIO RERIO* A PARTIR DEL E18-SOMITE CADA 24 HS PARA LA ESTACIÓN DE MONITOREO 3 DURANTE 336 (H)

ESTACIÓN DE MONITOREO 4 - CUENCA HÍDRICA ARROYO LAS CONCHITAS																
Concentración (%)	ZEBRATOX - EMBRIONES <i>DANIO RERIO</i> (E18-SOMITE)															Sobrevida (%)
	TIEMPO DE EXPOSICIÓN															
	ZEBRAGU					ZEBRACOR			ZEBRACRO							
	05-jul	06-jul	07-jul	08-jul	09-jul	10-jul	11-jul	12-jul	13-jul	14-jul	15-jul	16-jul	17-jul	18-jul	19-jul	
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h	240 h	264 h	288 h	312 h	336 h	
100	20	20	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14%
80	20	20	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14%
60	20	20	19	17	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	15	83%
40	20	20	19	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	15	86%
20	20	20	20	20	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	16	95%
Control	20	19	19	19	19	19	19	19	19	19	18	18	17	17	17	92%

CUADRO 16- REGISTRO DE SOBREVIDA DE EMBRIONES DE *DANIO RERIO* A PARTIR DEL E18-SOMITE CADA 24 HS PARA LA ESTACIÓN DE MONITOREO 4 DURANTE 336 (H)

6.4 Curvas de sobrevida de embriones de *danio rerio* a partir del E18-SOMITE

6.4.1 Estación de Monitoreo 1

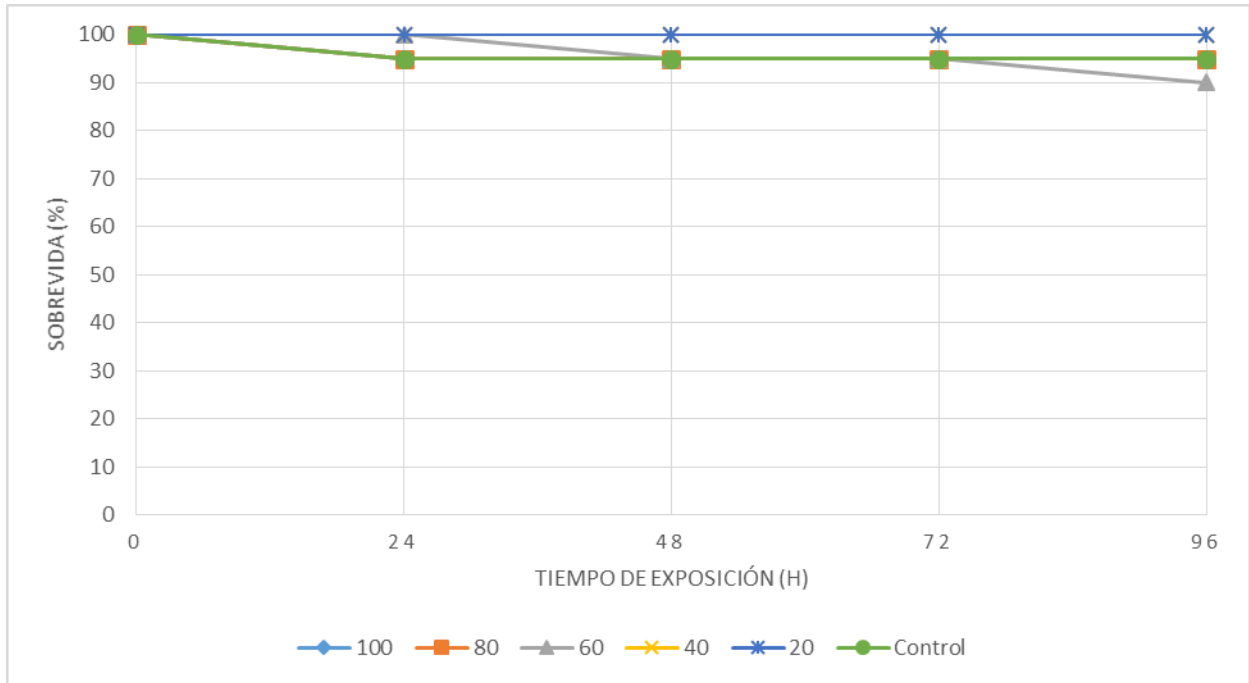


FIGURA 54- CURVAS DE SOBREVIDA DE EMBRIONES DE *DANIO RERIO* EXPUESTOS DE FORMA CONTINUA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MUESTRAS DEL ARROYO LAS CONCHITAS DURANTE 96 (H) PARA LA EM1-ZEBRAGU

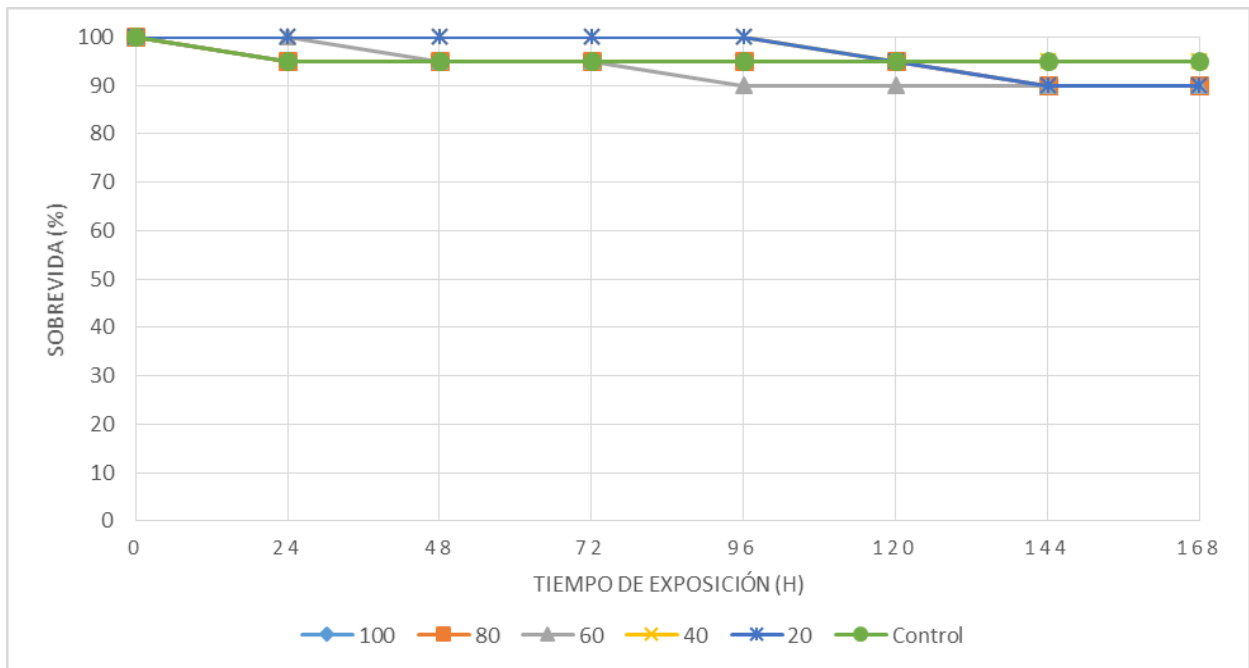


FIGURA 55- CURVAS DE SOBREVIDA DE EMBRIONES DE *DANIO RERIO* EXPUESTOS DE FORMA CONTINUA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MUESTRAS DEL ARROYO LAS CONCHITAS DURANTE 168 (H) PARA LA EM1-ZEBRACOR

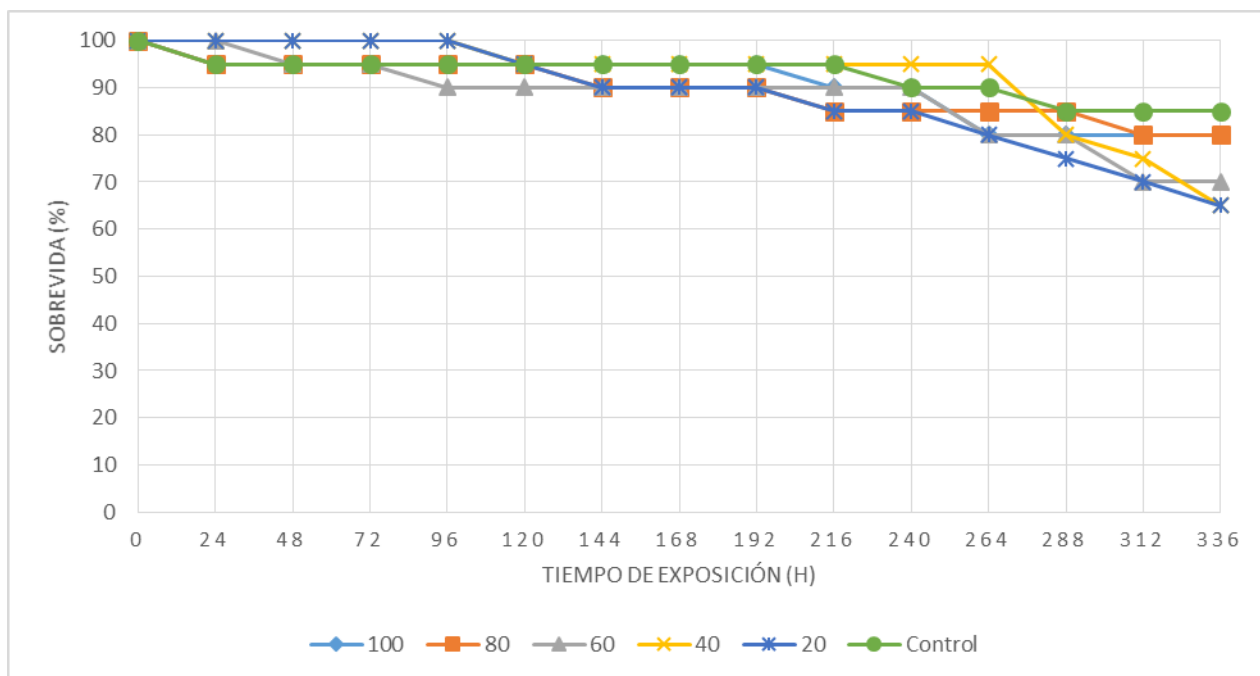


FIGURA 56- CURVAS DE SOBREVIDA DE EMBRIONES DE *DANIO RERIO* EXPUESTOS DE FORMA CONTINUA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MUESTRAS DEL ARROYO LAS CONCHITAS DURANTE 336 (H) PARA LA EM1-ZEBRACRO

La Figura 54, muestra las curvas de sobrevivencia de los embriones de *danio rerio* a partir del E18-SOMITE expuestos a distintas concentraciones con muestras del arroyo Las Conchitas y organismos de control. Esta permite visualizar que para un tiempo de exposición agudo no se verifica una toxicidad significativa en la muestra extraída en la Estación de Monitoreo N°1.

La Figura 55, refleja que ampliando la exposición a 168 h, la toxicidad para la Estación de Monitoreo N°1 continúa prácticamente sin modificaciones significativas.

La Figura 56, refleja que ampliando el tiempo de exposición a 336 h, se profundiza levemente el efecto tóxico (20% y 25% de mortalidad) pero continúa sin una diferencia significativa controles cuya sobrevivencia se mantuvo en un 85%.

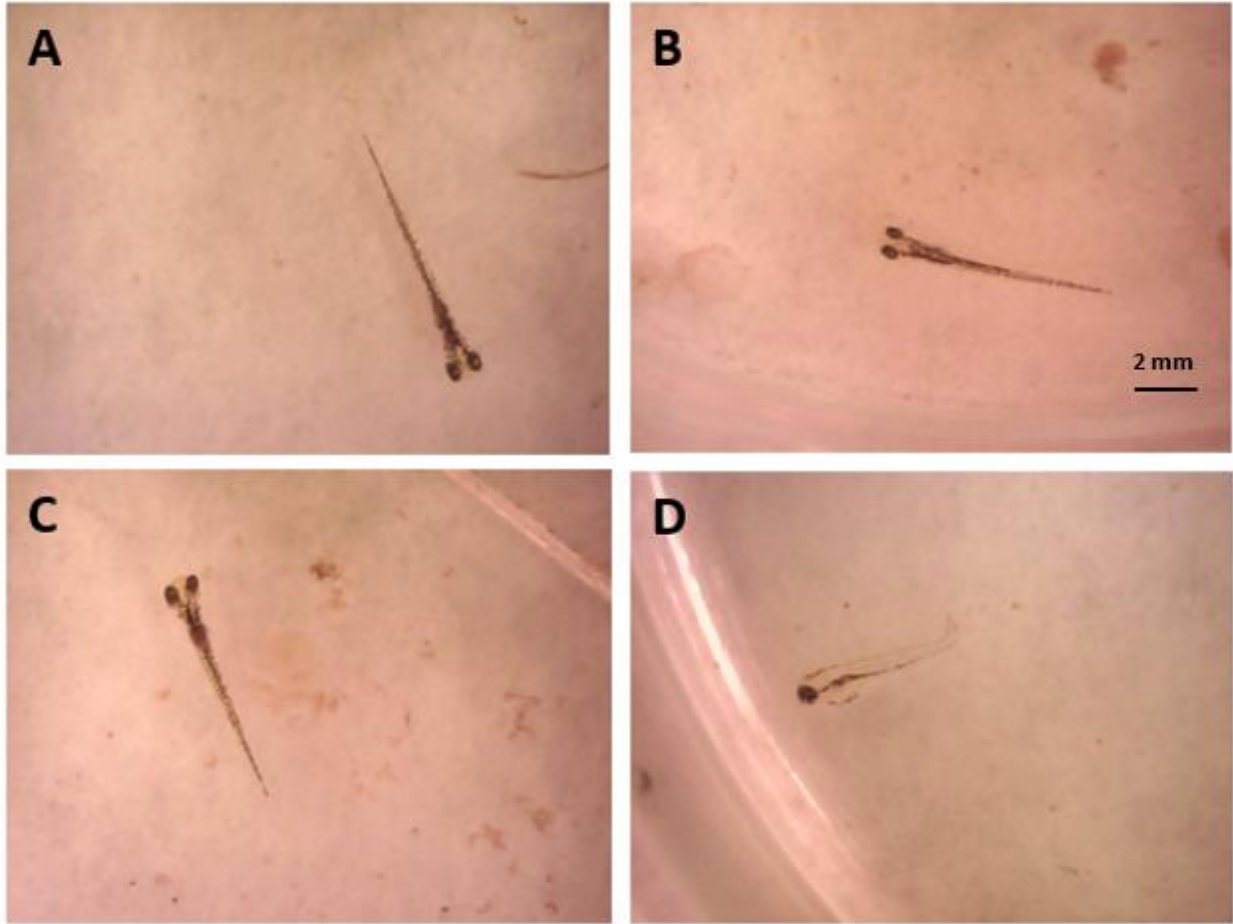


FIGURA 57- IMÁGENES DE MICROSCOPIA ESTEREOSCÓPICA DE EMBRIONES *DANIO RERIO* ECLOSIONADOS (A) EXPOSICIÓN AL 20% EN 96 H; (B) EXPOSICIÓN AL 40% EN 96 H; (C) EXPOSICIÓN AL 60% EN 96 H. EN LAS CONCENTRACIONES MENCIONADAS NO SE REGISTRAN OBSERVACIONES. (D) EXPOSICIÓN AL 80% EN 96 H, SE OBSERVA MALFORMACIÓN: COLA DORSAL DOBLADA Y PÉRDIDA DE LA PIGMENTACIÓN DE ORDEN GENÉTICO.

6.4.2 Estación de Monitoreo 2

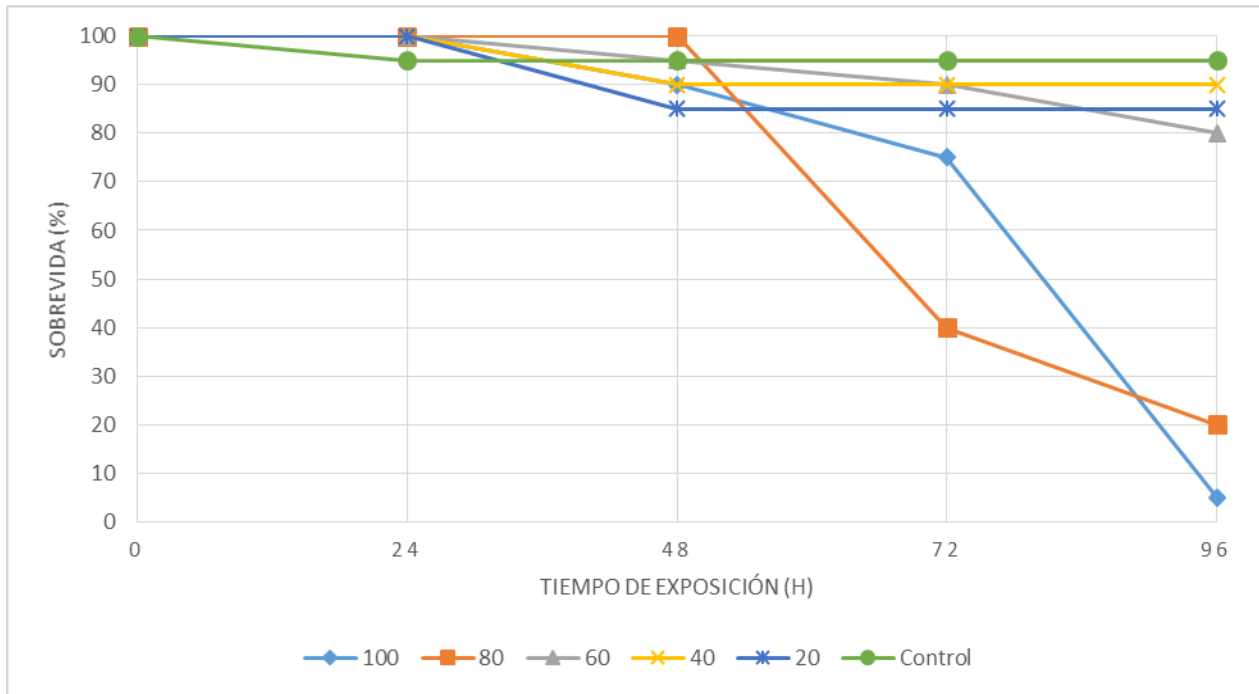


FIGURA 58- CURVAS DE SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES DE *DANIO RERIO* EXPUESTOS DE FORMA CONTINUA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MUESTRAS DEL ARROYO LAS CONCHITAS DURANTE 96 (H) PARA LA EM2-ZEBRAGU

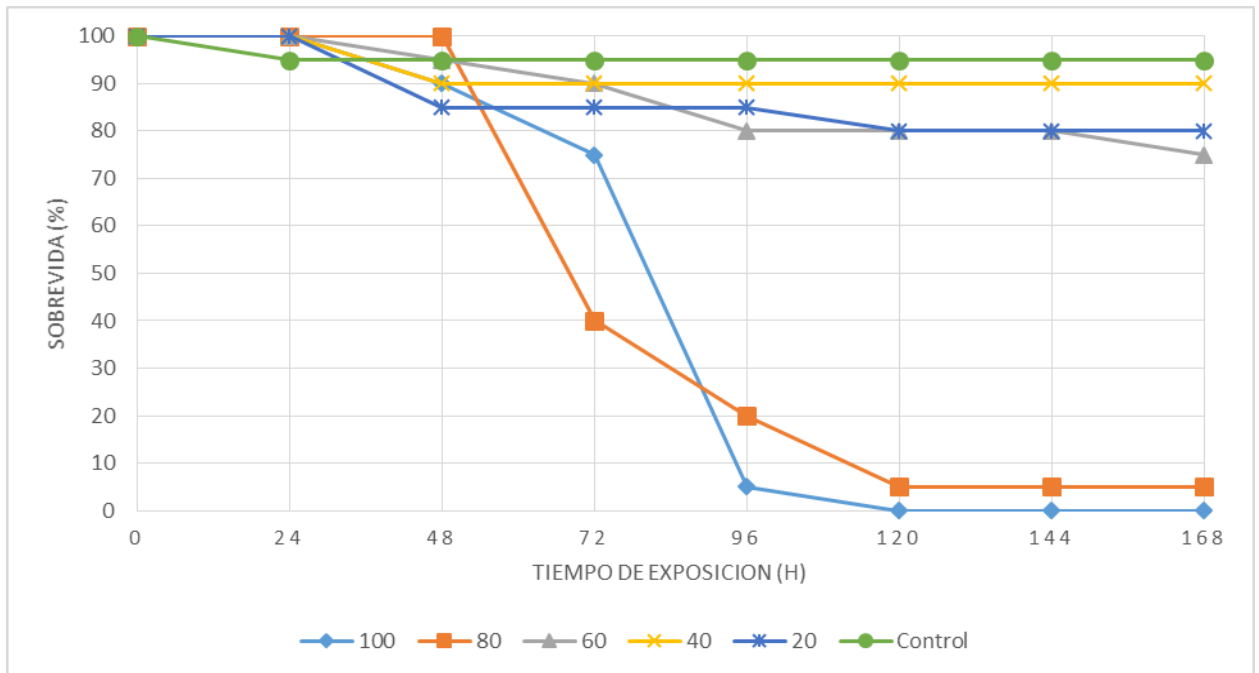


FIGURA 59- CURVAS DE SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES DE *DANIO RERIO* EXPUESTOS DE FORMA CONTINUA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MUESTRAS DEL ARROYO LAS CONCHITAS DURANTE 168 (H) PARA LA EM2-ZEBRACOR

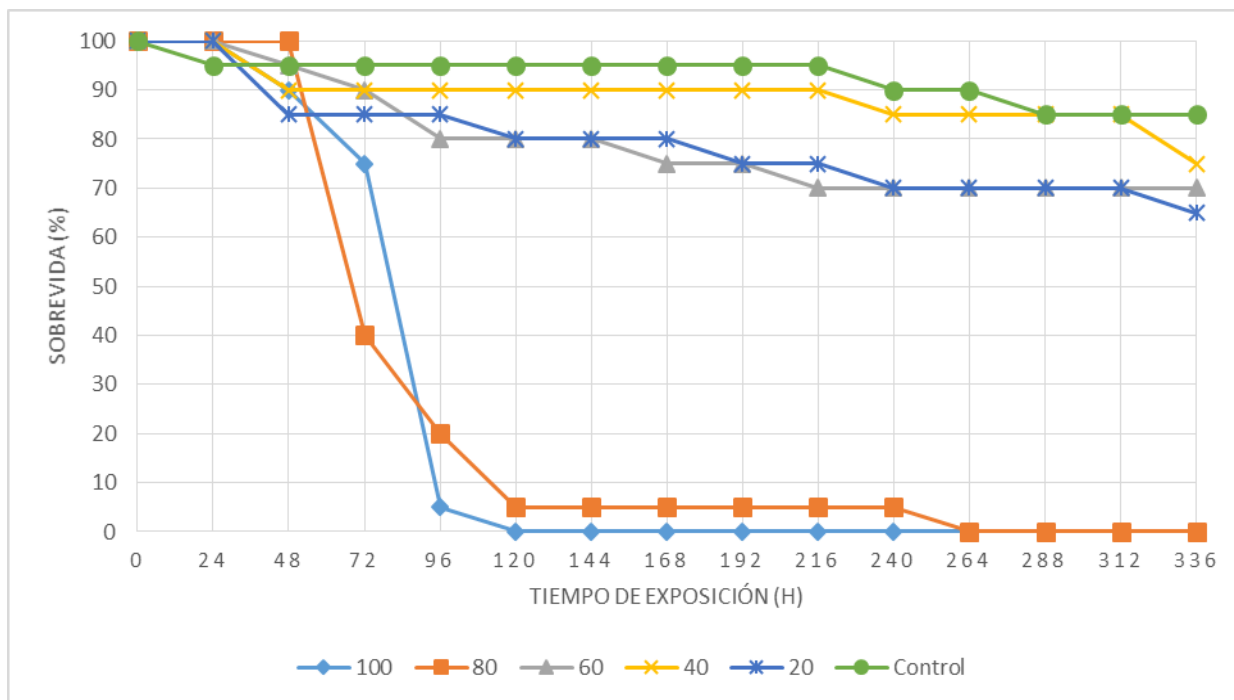


FIGURA 60- CURVAS DE SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES DE *DANIO RERIO* EXPUESTOS DE FORMA CONTINUA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MUESTRAS DEL ARROYO LAS CONCHITAS DURANTE 336 (H) PARA LA EM2-ZEBRACRO

La Figura 58, muestra como las curvas de sobrevivencia de los embriones expuestos a las concentraciones 100% y 80% caen precipitosamente hasta casi alcanzar una letalidad absoluta en tan solo 96 h. Se puede observar también como los embriones expuestos a concentraciones menores de la muestra no registran un efecto toxico destacable.

La Figura 59, los embriones expuestos a la concentración 100% mueren en su totalidad en 120 h de exposición. Al 80%, la curva de sobrevivencia es casi del 0% en 168 h de exposición. Al 60%, la curva de sobrevivencia de los embriones expuestos a 168 h tiende a reducirse un 5%. El resto de los embriones expuestos a las demás concentraciones como los organismos control mantienen prácticamente su curva de sobrevivencia en el periodo de exposición de 168 h.

La Figura 60, Los embriones expuestos al 80 % alcanzan un 100% de letalidad a las 264 h de exposición. Las concentraciones al 60% y 40% registran una sobrevivencia de casi el 60% en 336 h de exposición crónica.

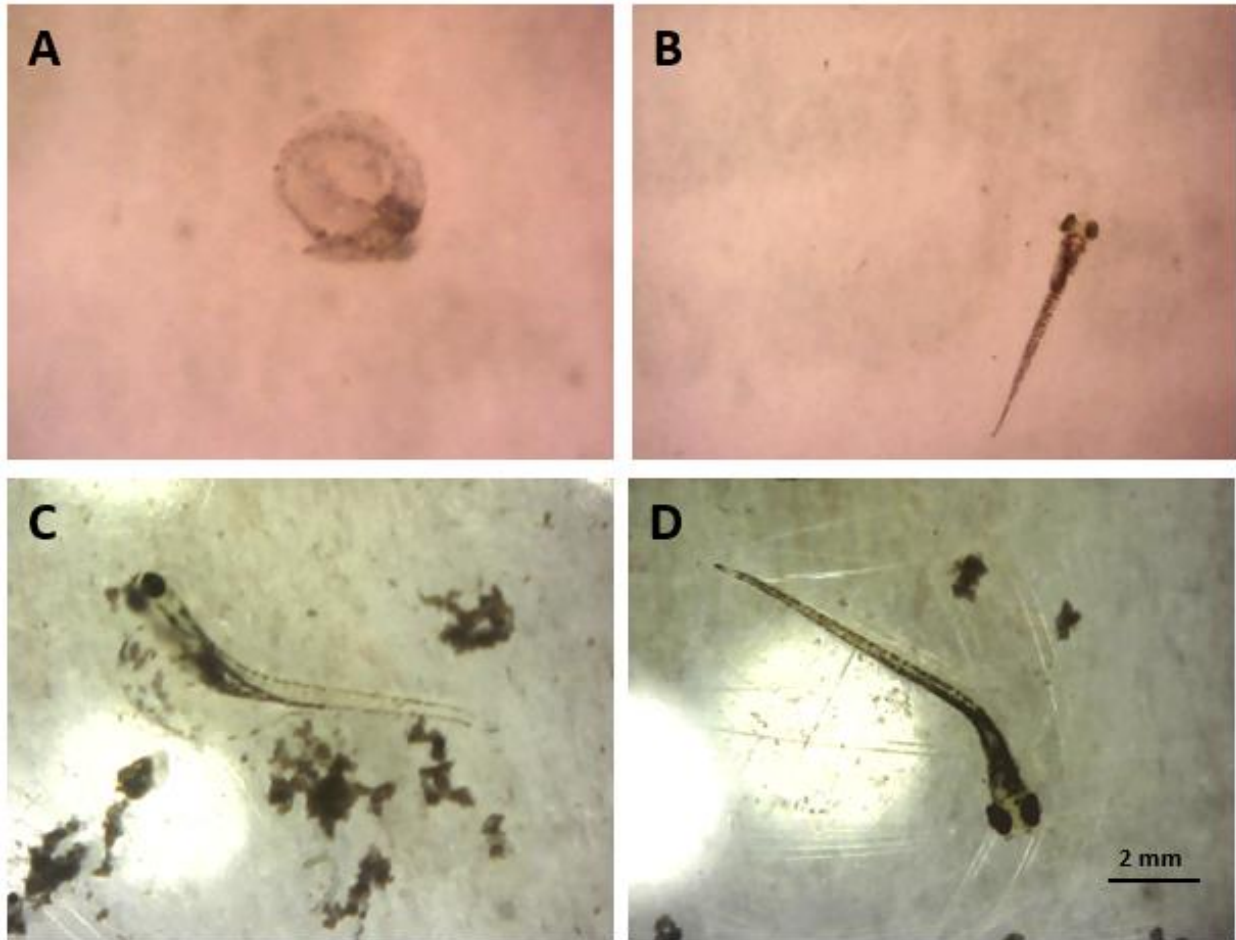


FIGURA 61- IMÁGENES DE MICROSCOPIA ESTEREOSCÓPICA DE EMBRIONES *DANIO RERIO* ECLOSIONADOS (A) EMBRIÓN SIN VIDA SIN ECLOSIONAR EXPUESTO 96 H AL 20%; (B) ORGANISMO CONTROL 96 H; (C) EXPOSICIÓN AL 60% 168 H, SE OBSERVA AUSENCIA DE PIGMENTACIÓN DE ORDEN GENÉTICO, HIDROPESÍA Y ONDULACIÓN VERTEBRAL (D) EXPOSICIÓN AL 20% 336 H, INCURVACIÓN DORSAL LATERAL.

6.4.3 Estación de Monitoreo 3

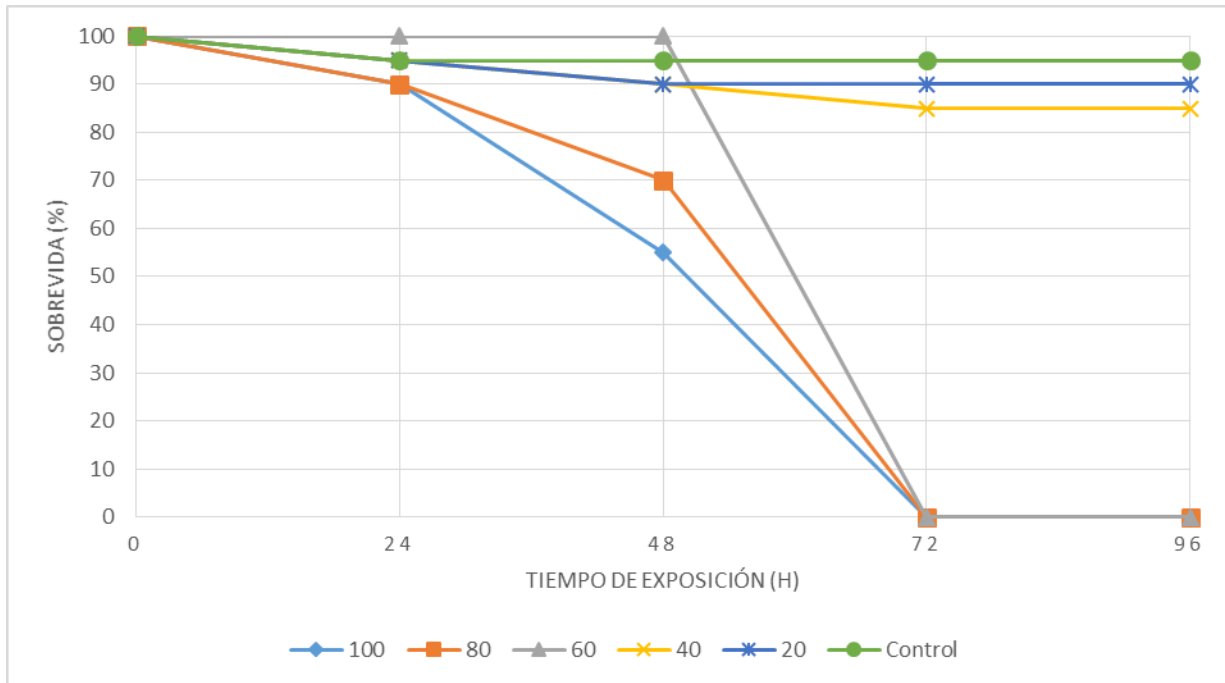


FIGURA 62- CURVAS DE SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES DE *DANIO RERIO* EXPUESTOS DE FORMA CONTINUA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MUESTRAS DEL ARROYO LAS CONCHITAS DURANTE 96 (H) PARA LA EM3-ZEBRAGU

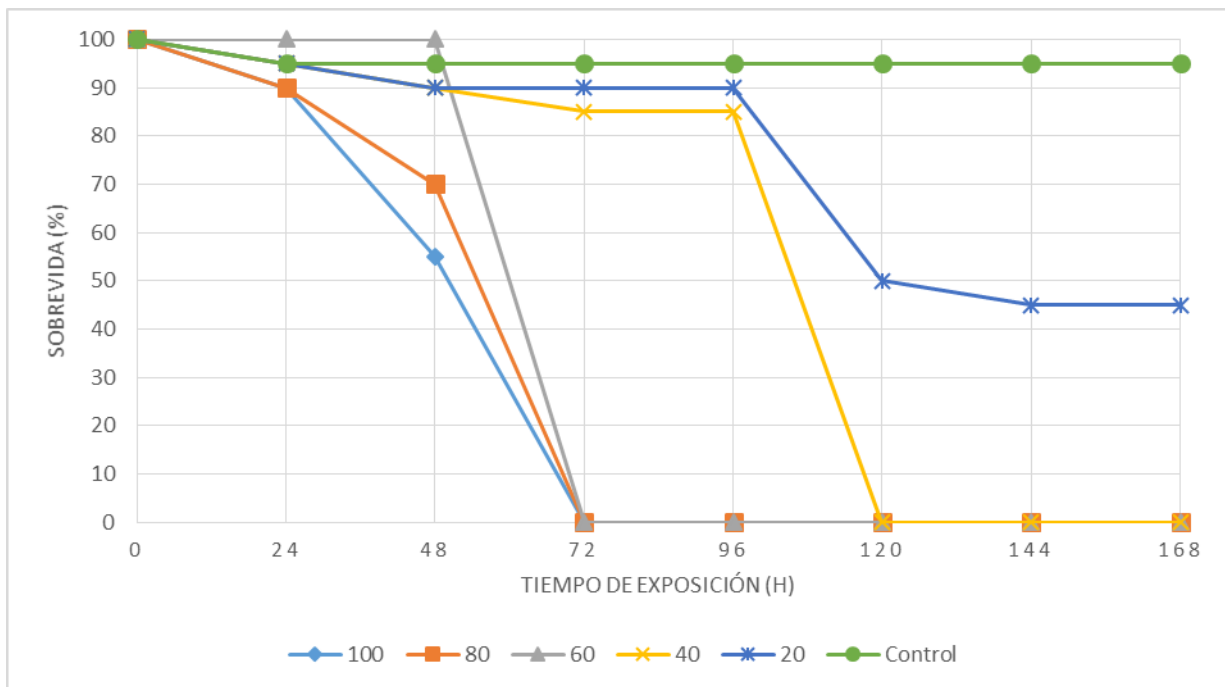


FIGURA 63- CURVAS DE SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES DE *DANIO RERIO* EXPUESTOS DE FORMA CONTINUA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MUESTRAS DEL ARROYO LAS CONCHITAS DURANTE 168 (H) PARA LA EM3-ZEBRACOR

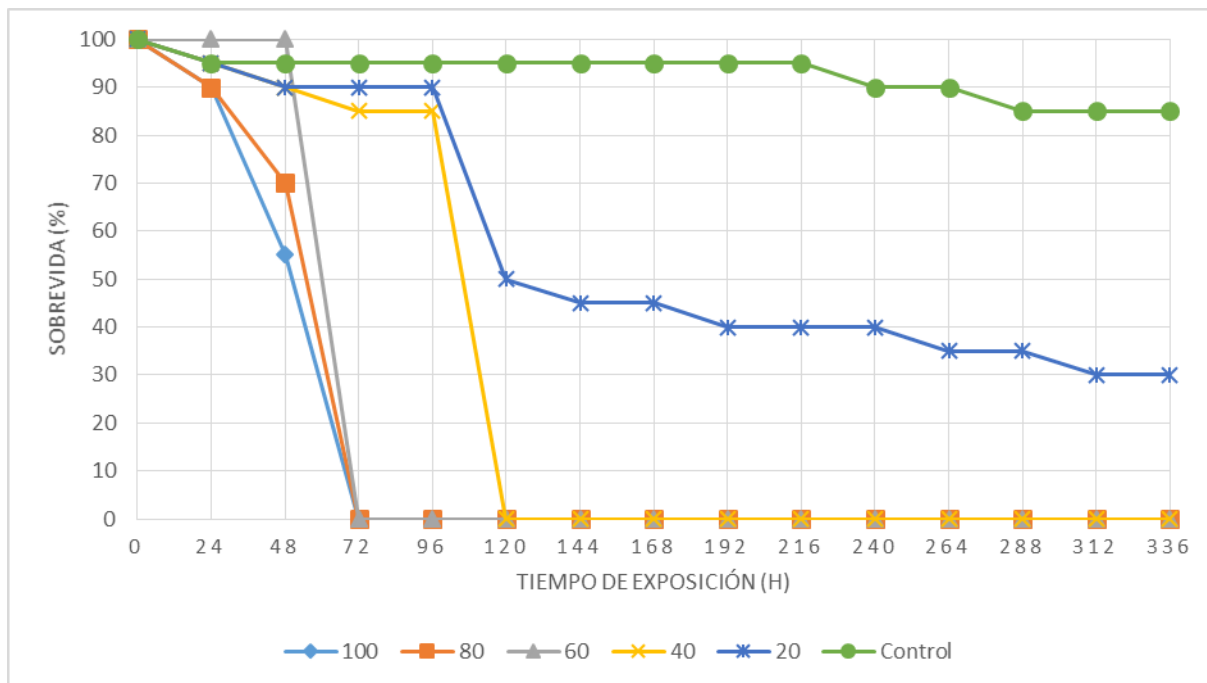


FIGURA 64- CURVAS DE SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES DE *DANIO RERIO* EXPUESTOS DE FORMA CONTINUA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MUESTRAS DEL ARROYO LAS CONCHITAS DURANTE 336 (H) PARA LA EM3-ZEBRACRO

La Figura 62, los embriones expuestos al 100%, 80% y 60% registraron una curva de sobrevivencia de 0% en tan solo 72 h, siendo la Estación de Monitoreo N°3 una de las que mayor toxicidad presenta en el periodo de exposición de toxicidad agua de 96 h. Los organismos control se mantienen estables. Y en las concentraciones al 40% y 20% no se observa una letalidad mayor al 10%.

La Figura 63, los embriones expuestos al 40% caen precipitosamente en la curva de sobrevivencia para el periodo de exposición crónica corta alcanzando una letalidad del 100% a 120 h. Al 20% se observó un decaimiento de la sobrevivencia de más del 50%. Todos ellos expuestos una exposición crónica corta de 168 h.

La Figura 64, solo se registra supervivencia en los embriones expuestos al 20%, no más del 30% en la curva de sobrevivencia y en los organismos control. Todos ellos con una exposición crónica de 336 h.

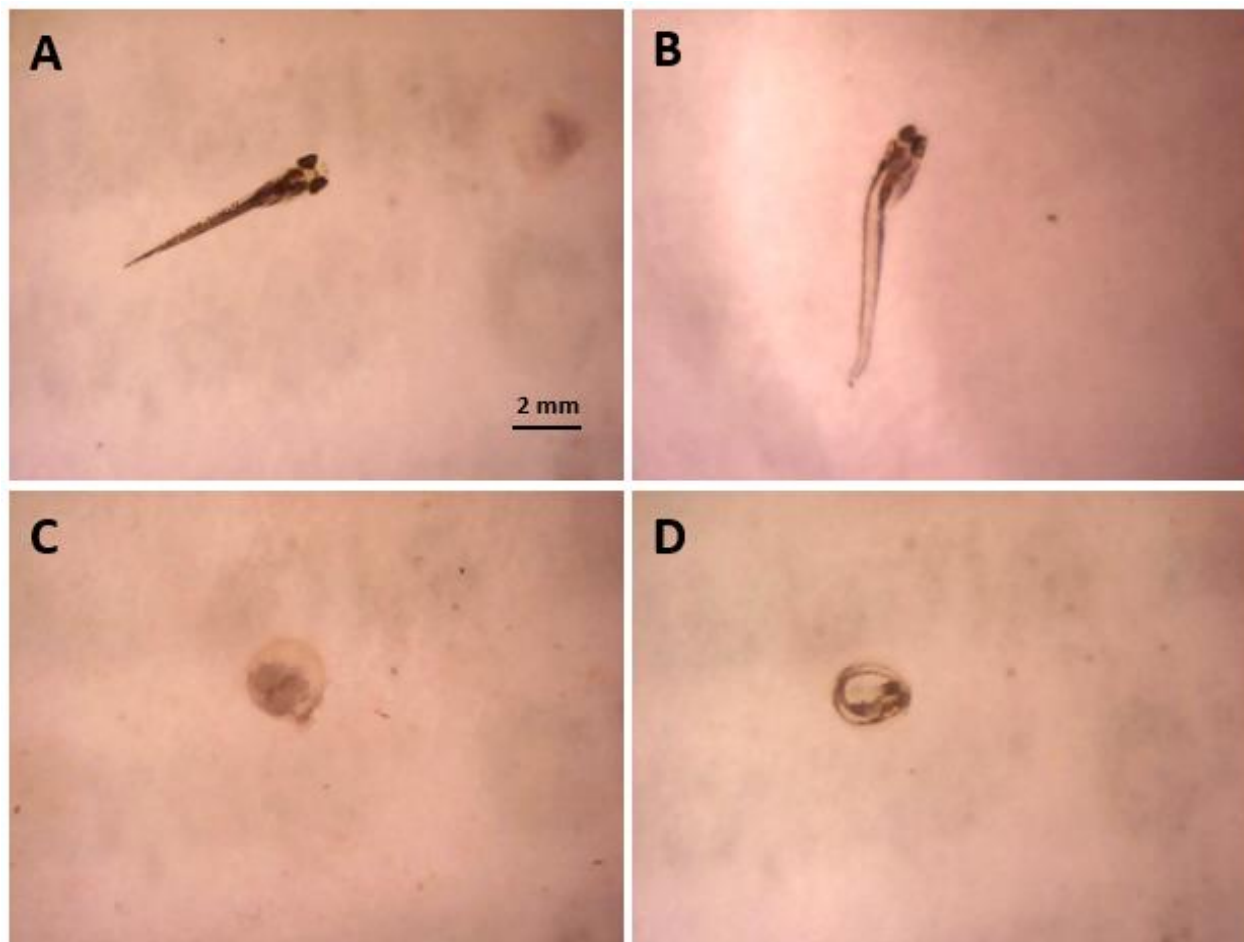


FIGURA 65- IMÁGENES DE MICROSCOPIA ESTEREOSCÓPICA DE EMBRIONES *DANIO RERIO* ECLOSIONADOS (A) EMBRIÓN ECLOSIONADO EXPUESTO AL 40% EN 48 H; (B) EMBRIÓN ECLOSIONADO EXPUESTO AL 60% EN 48 H, SE OBSERVA AUSENCIA DE PIGMENTACIÓN E INCURVACIÓN DORSAL, RETRASO EN EL DESARROLLO; (C) EMBRIÓN SIN VIDA, EXPUESTO AL 80% EN 48 H; (D) EMBRIÓN CON RETRASO EN EL DESARROLLO DE ECLOSIÓN EXPUESTO AL 80% EN 48H

6.4.4 Estación de Monitoreo 4

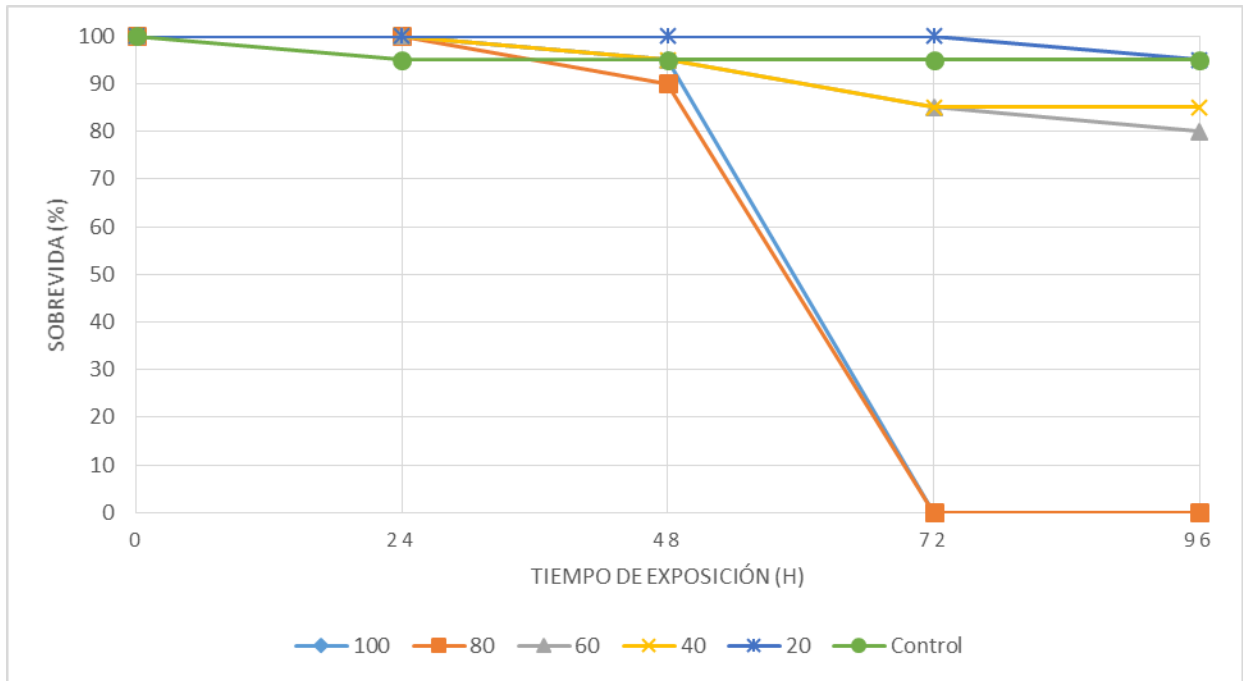


FIGURA 66- CURVAS DE SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES DE *DANIO RERIO* EXPUESTOS DE FORMA CONTINUA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MUESTRAS DEL ARROYO LAS CONCHITAS DURANTE 96 (H) PARA LA EM4-ZEBRAGU

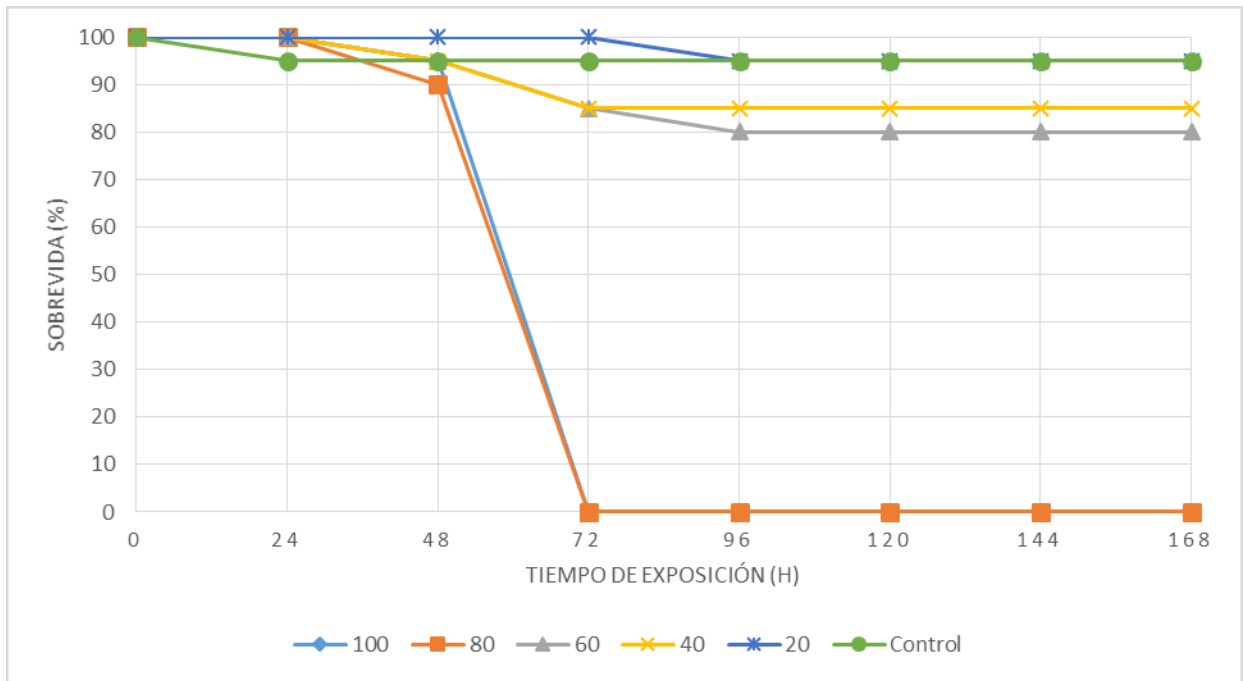


FIGURA 67- CURVAS DE SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES DE *DANIO RERIO* EXPUESTOS DE FORMA CONTINUA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MUESTRAS DEL ARROYO LAS CONCHITAS DURANTE 168 (H) PARA LA EM4-ZEBRACOR

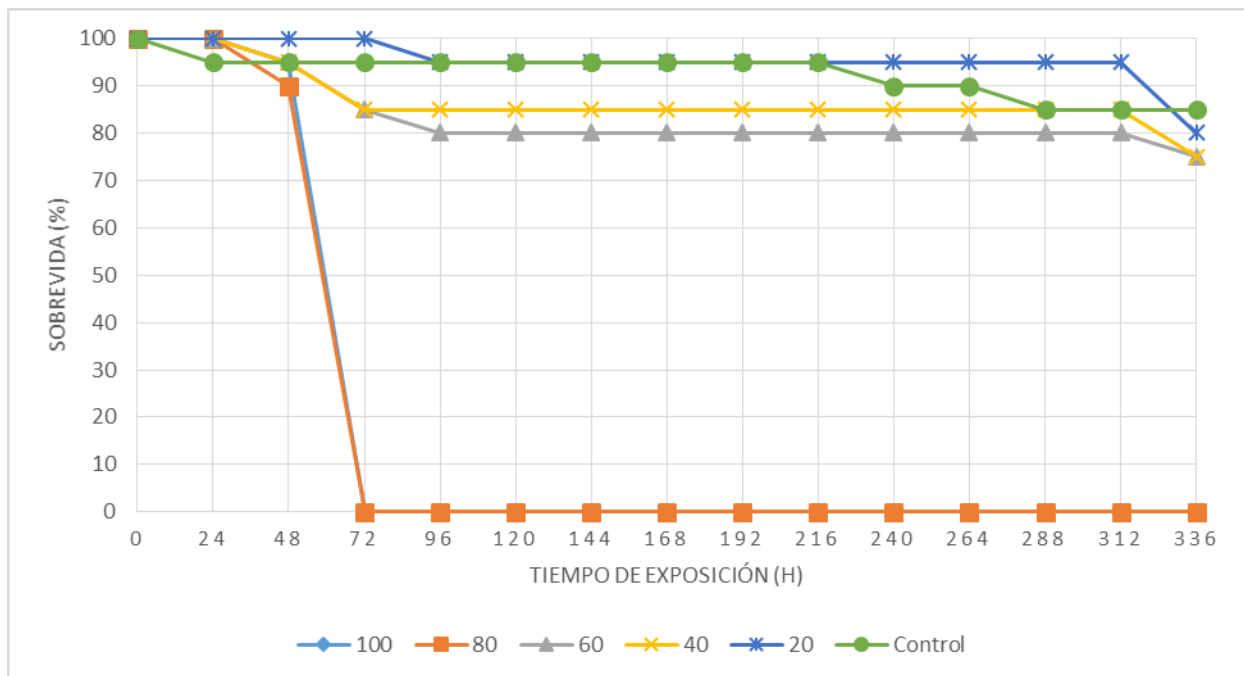


FIGURA 68- CURVAS DE SOBREVIDA DE EMBRIONES DE *DANIO RERIO* EXPUESTOS DE FORMA CONTINUA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MUESTRAS DEL ARROYO LAS CONCHITAS DURANTE 336 (H) PARA LA EM4-ZEBRACRO

La Figura 66, los embriones expuestos al 100% y 80% registran letalidad del 100% en 72 h. El resto de las concentraciones mantuvieron la curva de sobrevida por encima del 80%. Los organismos control se mantienen estable. Todos ellos expuestos a un periodo de 96 h para toxicidad aguda.

La Figura 67, la muestra al 60% reduce su curva de sobrevida hasta un 80% durante la exposición crónica corta en el lapso de 168 h.

La Figura 68, registra una curva de sobrevida por encima del 75% para el resto de las concentraciones durante la exposición crónica de 336 h.

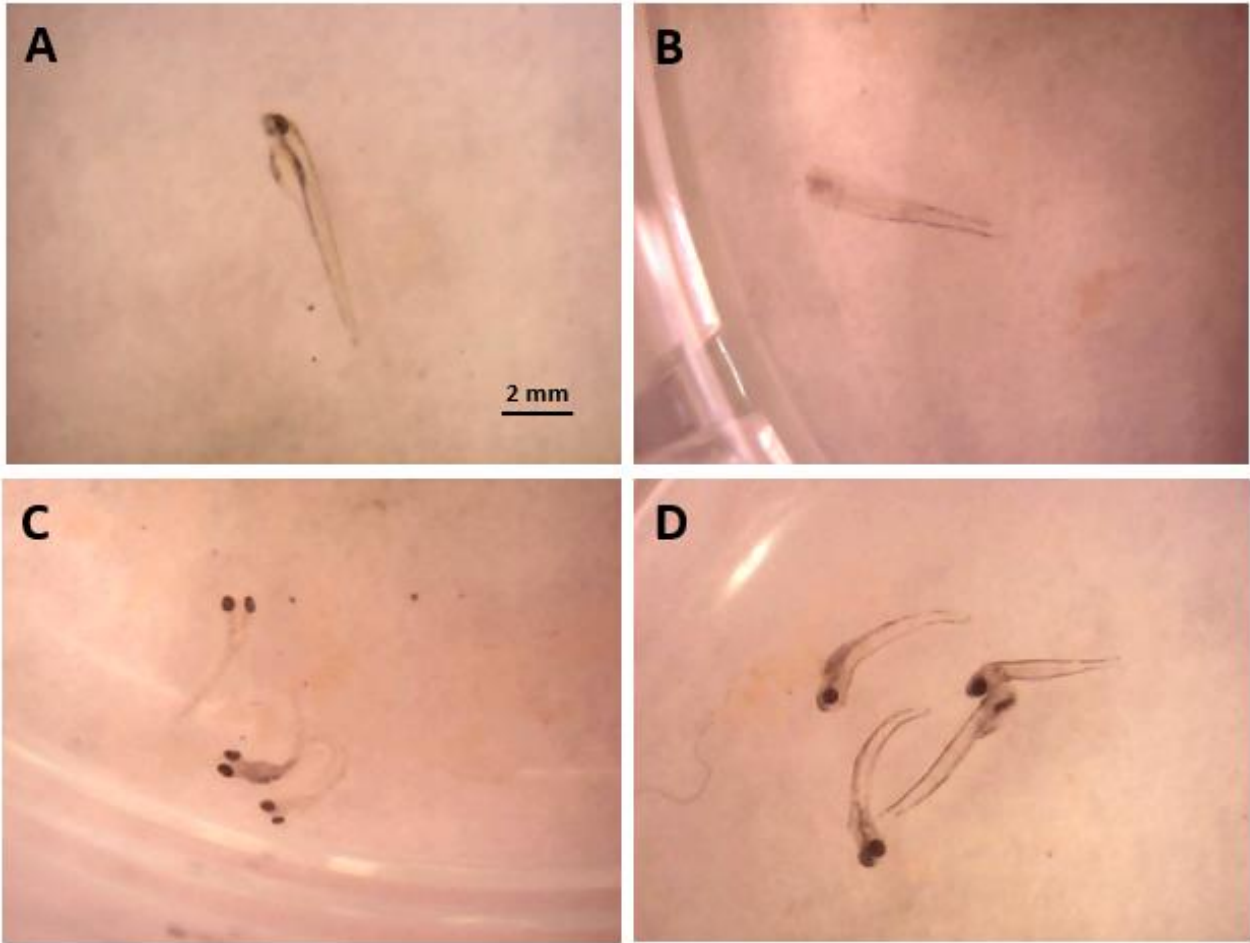


FIGURA 69- IMÁGENES DE MICROSCOPIA ESTEREOSCÓPICA DE EMBRIONES *DANIO RERIO* ECLOSIONADOS. (A) EMBRIÓN EXPUESTO AL 60% EN EL PERIODO DE TOXICIDAD AGUA DE 96 H, SE REGISTRA AUSENCIA DE PIGMENTACIÓN, AUSENCIA DE ALETA VENTRAL EN COLA; (B) EMBRIÓN MUERTO POS ECLOSIÓN, EXPUESTO AL 100% EN EL PERIODO DE TOXICIDAD AGUDA DE 96 H; (C) EMBRIONES DE *DANIO RERIO* SIN PIGMENTACIÓN, INCURVACIÓN DORSAL, RETRASO EN EL DESARROLLO DE CRECIMIENTO, EXPUESTOS AL 60% EN EL PERIODO DE TOXICIDAD AGUA; (D) EMBRIONES CON AUSENCIA DE PIGMENTACIÓN, COLA DOBLADA, INCURVACIÓN DORSAL Y RETRASO EN EL DESARROLLO DEL CRECIMIENTO. EXPUESTOS AL 60% EN EL PERIODO DE TOXICIDAD AGUA DE 96 H

6.5 Comparación de las curvas de sobrevida de las estaciones de monitoreo para las mismas concentraciones

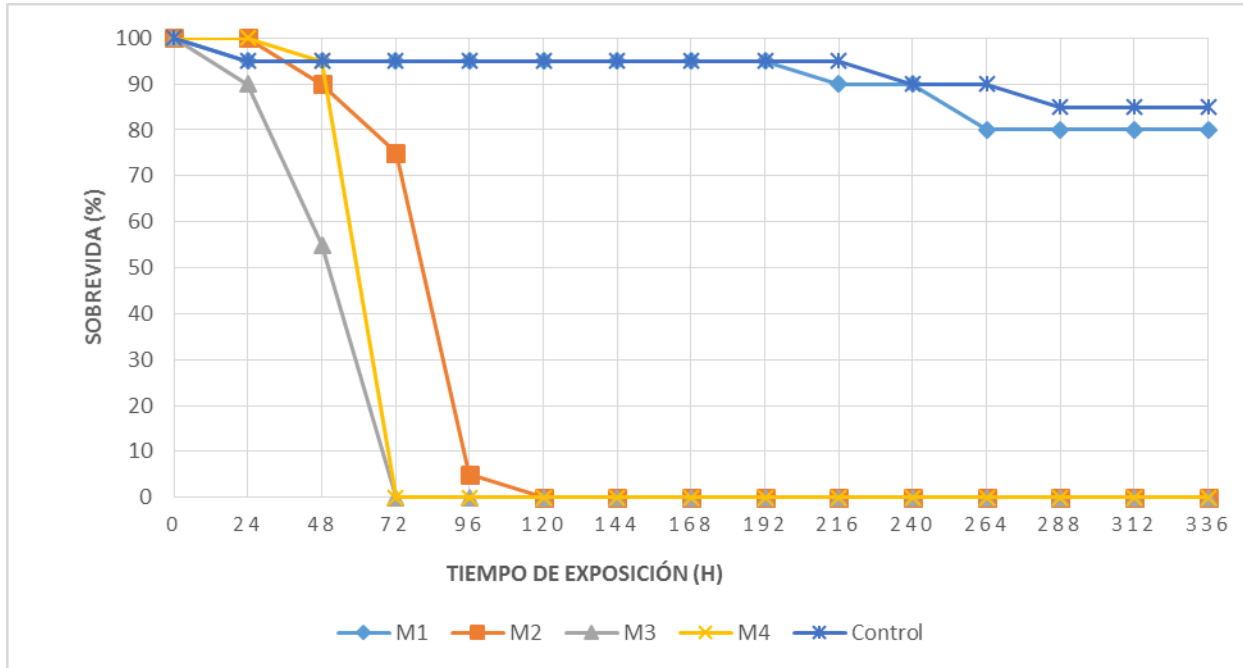


FIGURA 70- EMBRIONES DE *DANIO RERIO* (E18-SOMITE) EXPUESTOS AL 100% CON MUESTRA AMBIENTAL EN 336 H

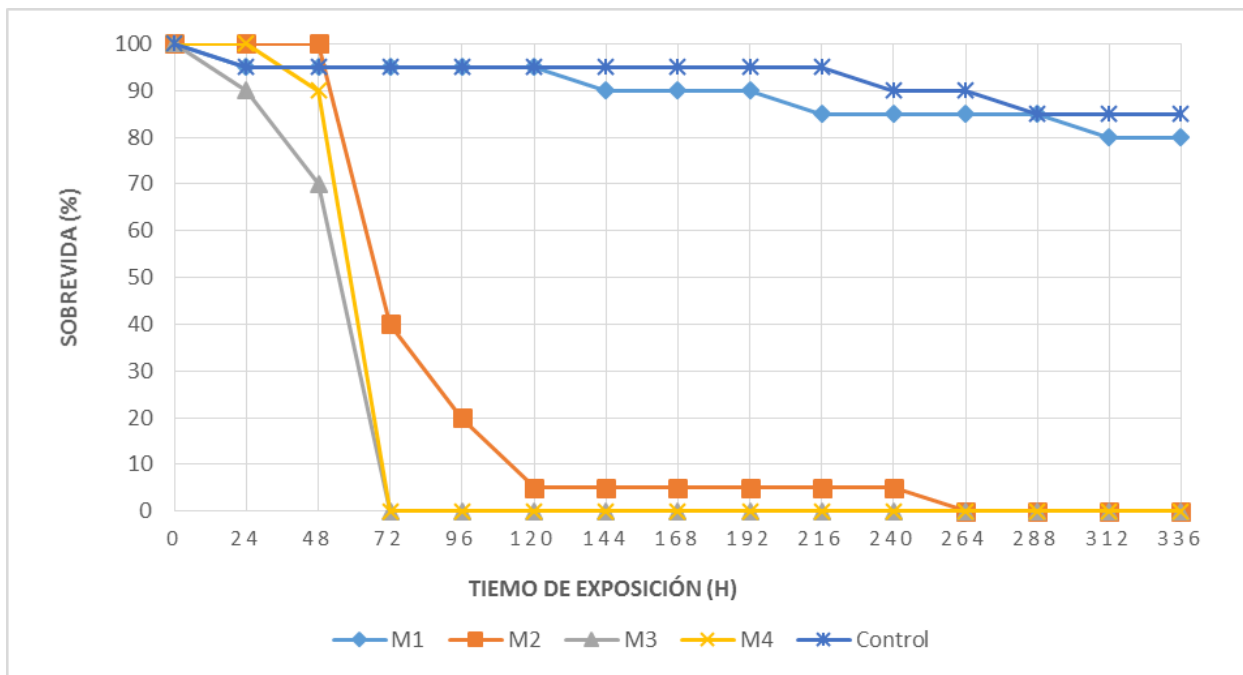


FIGURA 71- EMBRIONES DE *DANIO RERIO* (E18-SOMITE) EXPUESTOS AL 80% CON MUESTRA AMBIENTAL EN 336 H

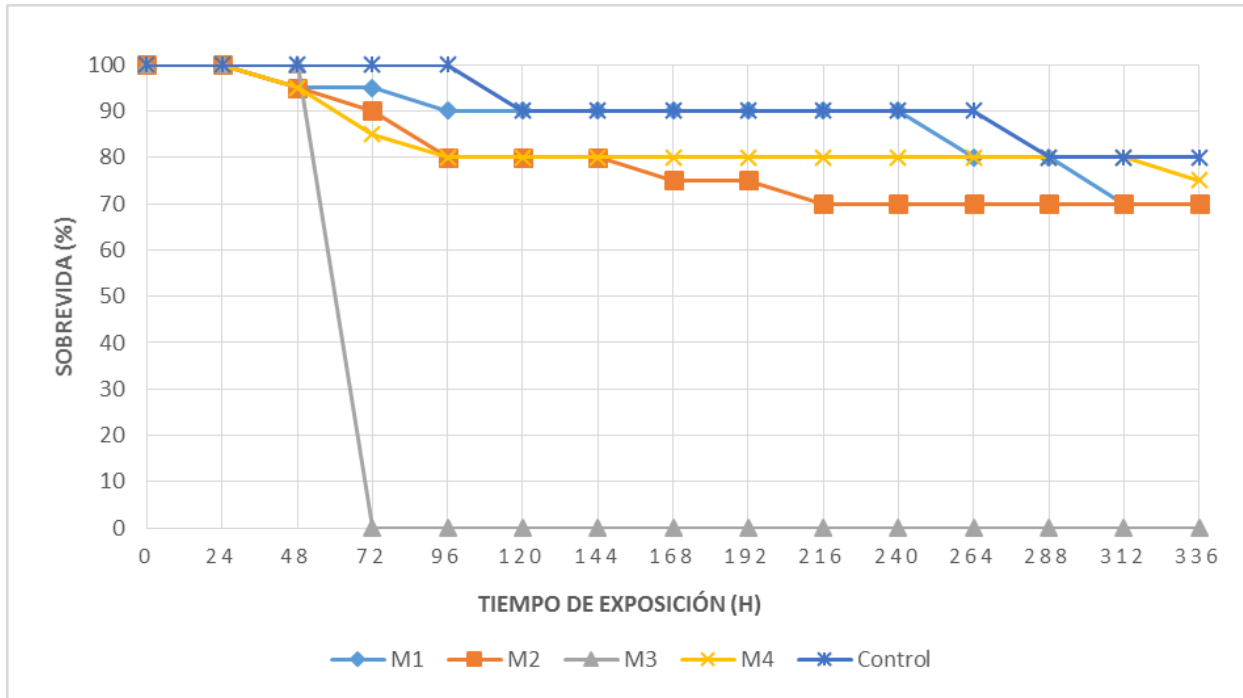


FIGURA 72- EMBRIONES DE *DANIO RERIO* (E18-SOMITE) EXPUESTOS AL 60% CON MUESTRA AMBIENTAL EN 336 H

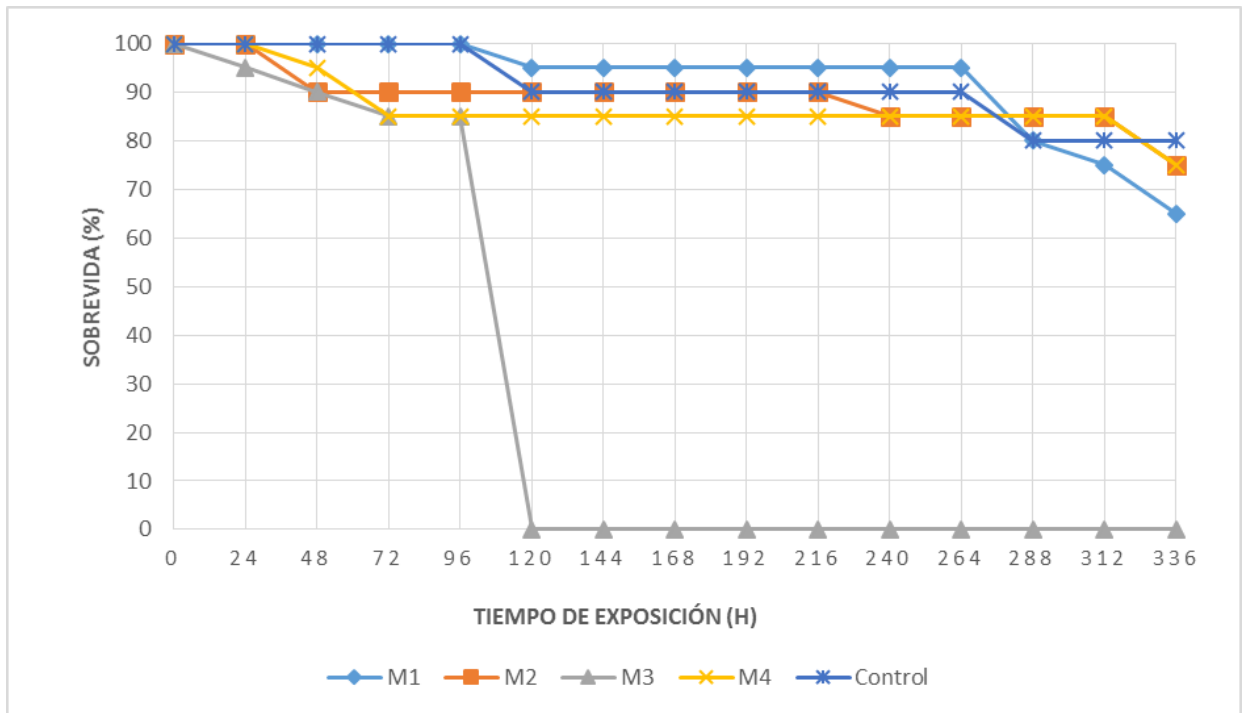


FIGURA 73- EMBRIONES DE *DANIO RERIO* (E18-SOMITE) EXPUESTOS AL 40% CON MUESTRA AMBIENTAL EN 336 H

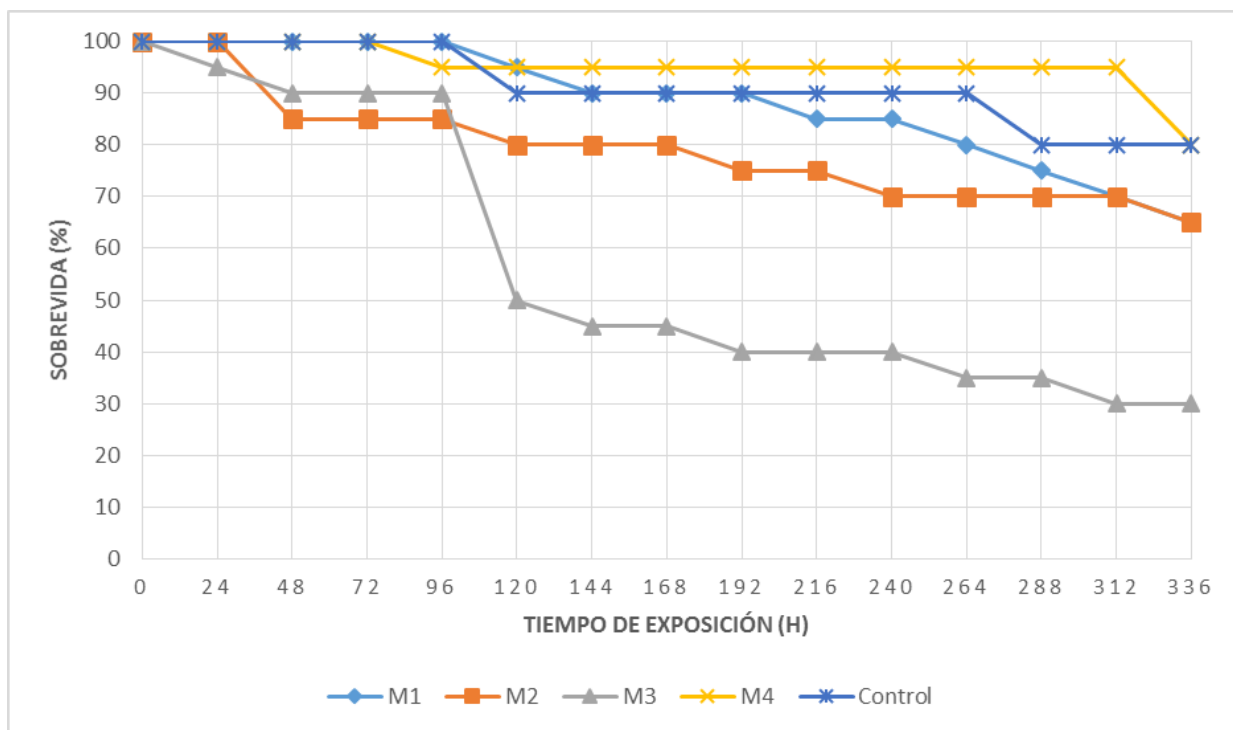


FIGURA 74- EMBRIONES DE *DANIO RERIO* (E18-SOMITE) EXPUESTOS AL 20% CON MUESTRA AMBIENTAL EN 336 H

6.6 Resultados ZEBRATOX

A partir de los registros y curvas de sobrevida obtenidos con embriones de pez *danio rerio* analizados con muestra de agua superficial de las 4 (cuatro) estaciones de monitoreo del arroyo Las Conchitas, los resultados toxicidad se expresaron en Unidades de Toxicidad Crónica y Unidades de Toxicidad Aguda. Los resultados obtenidos fueron:

ESTACIÓN DE MONITOREO	NOEC 168 h (%)	UTcc 168 h	NOEC 336 h (%)	UTc 336 h
M1	100	1,0	100	1,0
M2	60	> 1,7	60	> 1,7
M3	20	> 5,0	20	> 5,0
M4	60	> 1,7	60	> 1,7

CUADRO 17- UNIDADES DE TOXICIDAD CRÓNICO CORTO Y TOXICIDAD CRÓNICO (UTcc; UTc)

ESTACIÓN DE MONITOREO	CL 50 96 h (%)	UTa 96 h
M1	0	< 0.3
M2	60	2
M3	20	5
M4	60	2

CUADRO 18- UNIDADES DE TOXICIDAD AGUDA (UTA)

De todas las estaciones relevadas; la Estación de Monitoreo N°1 correspondiente al Parque Ecológico Cultural Guillermo Hudson tampoco presentó toxicidad. Para el periodo de exposición aguda no se registró toxicidad siendo el valor expresado en UTa < 0.3 (valor límite máximo para ese tiempo de exposición) y en los de toxicidad crónica registró un valor de 1, esto significa que tampoco existe toxicidad.

Para la Estación de Monitoreo N°2, el valor de UTa es de 2; esto significa que como mínimo estaría 6 (seis) veces por encima del límite para toxicidad aguda. Con respecto a la UTc, el valor de toxicidad fue algo inferior registrándose 1,7.

Con respecto a la Estación de Monitoreo N°3, se registró un valor para la UTa igual a 5; encontrándose como mínimo 16 (dieciséis) veces por encima del límite para toxicidad agua. Siendo este el valor el más alto para este periodo de exposición detectado en las cuatro estaciones de monitoreo. Para las UTc, también se registró un valor de 5.

Y por último, en la Estación de Monitoreo N°4 se registró un valor de 2 para las UTa estando como mínimo 6 (seis) veces por encima del límite para toxicidad aguda. Finalmente para las UTc el valor de toxicidad fue algo inferior registrándose 1,7.

CAPÍTULO 7:

CONCLUSIONES GENERALES

7.1 Conclusión sobre los parámetros fisicoquímicos obtenidos del arroyo Las Conchitas

La evaluación de los efectos de toxicidad en períodos de exposición aguda y crónica de las muestras extraídas del arroyo Las Conchitas sobre el desarrollo embrionario del anfibio *rhinella arenarum* y pez *danio rerio*, resultó ser más alarmante de lo esperado en base a los parámetros fisicoquímicos históricos o los medidos en el presente trabajo, lo que expresa efectos sinérgicos entre diferentes agentes que afectan severamente la sobrevivencia de los organismos utilizados en los bioensayos de toxicidad.

Los análisis fisicoquímicos de las estaciones de monitoreo obtenidos en el laboratorio reflejaron una relación directa entre el tipo de actividad industrial predominante en la región con los detectados en cada estación.

En la Estación de Monitoreo N°3, una zona con fuerte actividad curtiembre, se detectaron niveles de cromo total (única estación donde se detectó), y sulfuros cuatro veces por encima del valor detectado en el resto de las estaciones. Sucede lo mismo para el caso del Níquel (Ni), en las Estaciones de Monitoreo N°2, N°3 y N°4 se registraron valores que se duplican y triplican al momento de compararlos con la Estación de Monitoreo N°1, siendo que aguas arriba de la primera estación no se registra actividad industrial. En cambio, para el resto de las estaciones existen actividades industriales vinculadas al tratamiento químico de metales, fabricación y reparación de baterías, entre otras.

Sorprendentemente los valores obtenidos para la demanda biológica de oxígeno (DBO₅) y demanda química de oxígeno (DQO) de la Estación de Monitoreo N°4, donde se esperaban encontrar altas concentraciones ya que allí se radican una gran cantidad de barrios cerrados, complejos recreativos y countries, se mantuvieron similares a los de la Estación de Monitoreo N°1 y N°2. No así para la Estación de Monitoreo N°3, donde los valores prácticamente se duplicaron en relación al resto de las estaciones. Este incremento podría deberse a la ausencia de servicios cloacales en la zona, ya que sobre los márgenes del arroyo se radican una gran cantidad de viviendas que constituyen una serie de barrios populares y socialmente sensibles, con ausencia de servicios sanitarios. Es presumible que tanto los efluentes cloacales y los domiciliarios de esta zona se viertan de forma directa y clandestina a las aguas del arroyo impactando directamente en la Estación de Monitoreo N°3. También se detectaron valores elevados de Cobalto (Co) y Cobre (Cu) en las Estaciones de Monitoreo N°2 y N°3. Con respecto al oxígeno no se detectaron zonas anóxicas (ausencia de oxígeno), siendo el valor más bajo registrado en la Estación de Monitoreo

Nº4 con 3,32 mg/L. Es importante aclarar que los valores de conductividad y sólidos disueltos totales de las Estaciones de Monitoreo Nº2, 3 y 4 están como mínimo 5 (cinco) veces por encima de los detectados en la Estación de Monitoreo Nº1.

Al momento de aplicar los valores guía de referencia establecido en la Tabla II- Niveles guía de calidad de agua para protección de vida acuática, agua dulce superficial, del Anexo II del Decreto 831/93 reglamentario de la Ley 24.051 de Residuos peligrosos nos encontramos con analítos que se encuentran por encima de la norma. Con esta tabla se pudo comprobar que la Estación de Monitoreo Nº2 supera casi por 4 (cuatro) veces el valor guía de referencia para el Níquel (Ni); la Estación de Monitoreo Nº3 supera por casi 4 (cuatro) veces el valor guía de referencia para el Cromo total (Cr), tomando como referencia el valor máximo de 0,002 mg/L establecido para la protección de la vida acuática fitoplancton y zooplancton.

A fin de tener una comparación más visible y objetiva del impacto ambiental antropogénico generado sobre el arroyo Las Conchitas en relación a los parámetros fisicoquímicos detectados, se usó el mismo modelo de calidad de aguas para la Franja Costera Sur del Río de la Plata desarrollado por el Instituto Nacional del Agua (INA); Autoridad de Cuenca Matanza Riachuelo (ACUMAR) y la Universidad Tecnológica Nacional Regional Avellaneda (UTN-FRA) (INA, 2011). Presentado en el marco del Plan Integral de Saneamiento Ambiental de la Cuenca Hídrica Matanza Riachuelo (PISA) con la intención de efectuar un diagnóstico de situación en cuanto a posibilidades de uso de las aguas (consumo humano, recreación, preservación de vida acuática). Usando este modelo, podría clasificarse al arroyo Las Conchitas bajo la misma categoría de uso que la cuenca hídrica Matanza Riachuelo. Siendo esta de: “Uso IV- Apta para actividades recreativas pasivas”. Contemplando actividades recreativas que apuntan sólo al disfrute estético - apreciación del paisaje, circuitos pedestres, sendas para “jogging”, “footing” y ciclismo.

7.2 Conclusión sobre los estudios ecotoxicológicos obtenidos del arroyo Las Conchitas

Los efectos de toxicidad de las muestras obtenida del arroyo Las Conchitas en periodos de exposición aguda y crónica sobre el desarrollo embrionario del anfibio *rhinella arenarum* (ANFITOX) y pez *danio rerio* (ZEBRATOX), resultaron mucho más tóxicas de lo estimado. Los valores de toxicidad obtenidos en este trabajo son tan o aún más graves que lo informado en el trabajo anterior del año 2002 (Herkovits, y otros, 2003). A tal punto que en algunos casos no se pudo informar un valor exacto para las unidades de toxicidad sino simplemente se expresó que el resultado fue mayor al valor detectado debido a que se registraron altos niveles de mortalidad aún

en muestras muy diluidas con solución de mantenimiento fisiológico (ANFITOX y ZEBRATOX). A partir de las curvas y registros de sobrevivencia de los embriones de *rhinella arenarum* y *danio rerio* de las 4 (cuatro) estaciones de monitoreo se ratificó que de todas las estaciones relevadas; la Estación de Monitoreo N°1 correspondiente al Parque Ecológico Cultural Guillermo Hudson no presenta toxicidad para los periodos de exposición aguda ni crónica. En cambio, las Estaciones de Monitoreo N°2 y N°4 si bien presentaron letalidad aguda, la estación de monitoreo con mayor registro de toxicidad aguda tanto para los bioensayos de ANFITOX y ZEBRATOX fue la Estación de Monitoreo N°3. Siendo el gradiente de toxicidad para las aguas superficiales del arroyo Las Conchitas el siguiente: EM°3>EM°2>EM°4>EM°1. Presentándose un cambio en el orden de la estación de monitoreo más tóxica con respecto al estudio realizado en el año 2002 (Herkovits, y otros, 2003), siendo en aquella oportunidad la muestra más tóxica la extraída en la Estación de Monitoreo N°2. Considerando que el valor máximo de toxicidad admitido como valor de referencia para efluentes industriales es 0,3 y 1 para toxicidad aguda y crónica respectivamente (USEPA, 1991), la magnitud de la toxicidad del arroyo Las Conchitas queda documentada con los valores obtenidos para exposición aguda ya que en el caso de la crónica ha superado nuestra previsión en cuanto a magnitud.

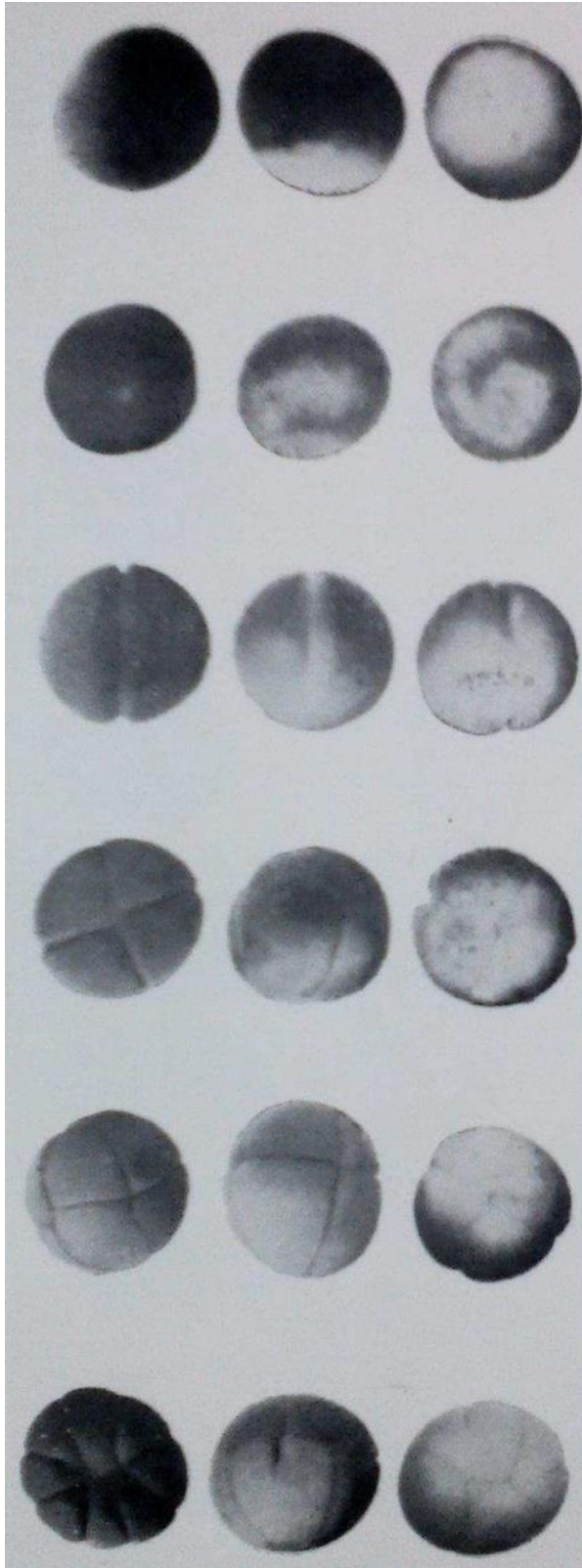
Si bien ya desde la toxicidad aguda, los embriones de anfibio *rhinella arenarum* resultaron ser más sensibles que los de pez *danio rerio*, el presente estudio revela que ambos bioensayos pueden documentar en forma razonablemente similar la toxicidad del arroyo en los diferentes puntos de muestreo.

El estudio también revela la necesidad de ampliar el rango de diluciones con las que se realicen los ensayos de toxicidad a futuro, en la medida que los actuales rangos utilizados superaron nuestras previsiones de toxicidad.

ANEXOS

Anexo I

Los primeros estadios del desarrollo en *bufo arenarum* (Del Conte & Sirlin, 1951)



Estadio 1 0 horas
FECUNDACIÓN

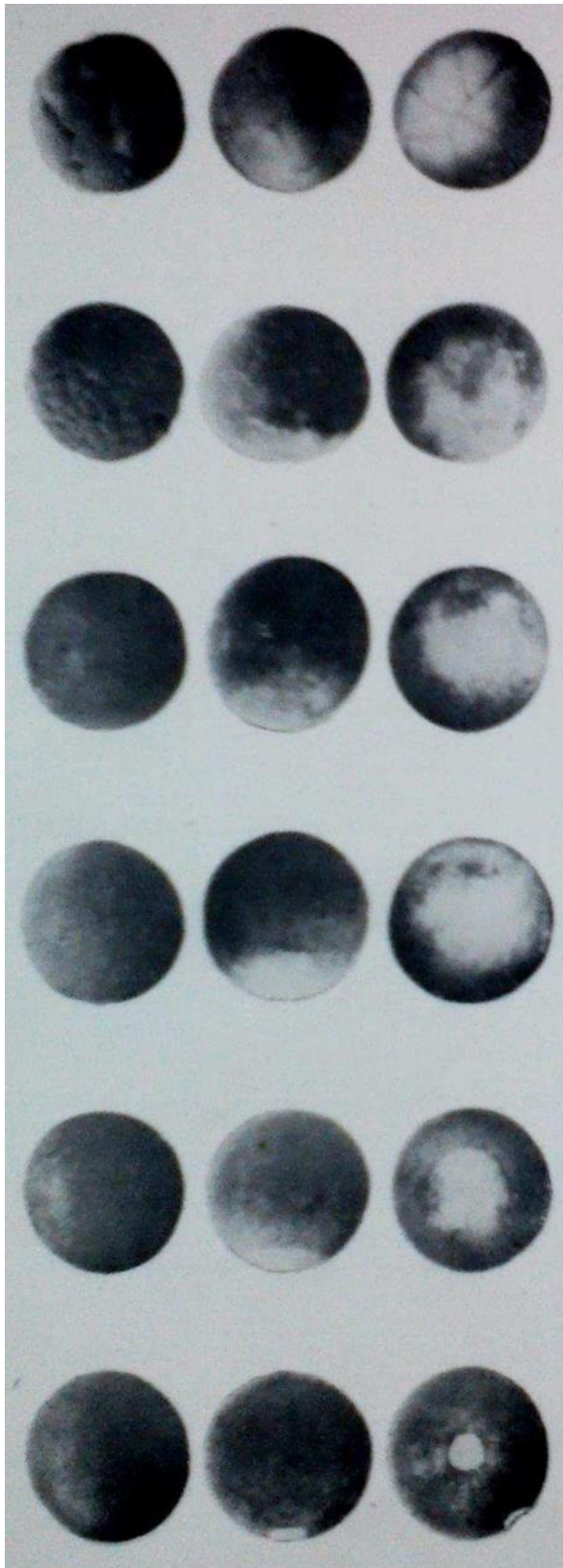
Estadio 2 1 hora
MEDIA LUNA GRIS

Estadio 3 3 horas
PRIMER HENDIMIENTO
(1-2 blastómeros)

Estadio 4 4 horas
SEGUNDO HENDIMIENTO
(2-4 blastómeros)

Estadio 5 5 horas
TERCER HENDIMIENTO
(8 blastómeros)

Estadio 6 5 1/2 horas
CUARTO HENDIMIENTO
(12-16 blastómeros)



Estadio 7 6 1/2 horas
QUINTO HENDIMIENTO
(24-32 blastómeros)

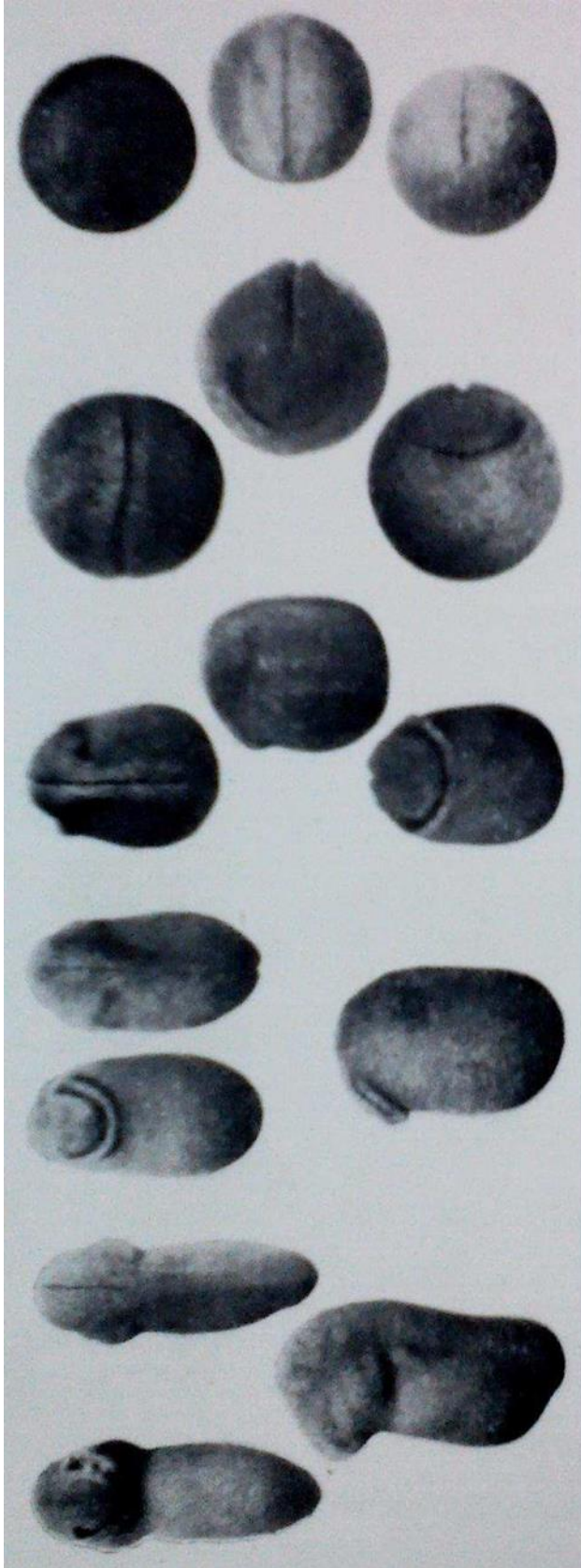
Estadio 8 12 horas
BLÁSTULA MEDIA

Estadio 9 18 horas
BLÁSTULA TARDÍA

Estadio 10 22 horas
LABIO DORSAL
DEL BLASTOPORO

Estadio 11 27 horas
GÁSTRULA MEDIA

Estadio 12 34 horas
GÁSTRULA TARDÍA



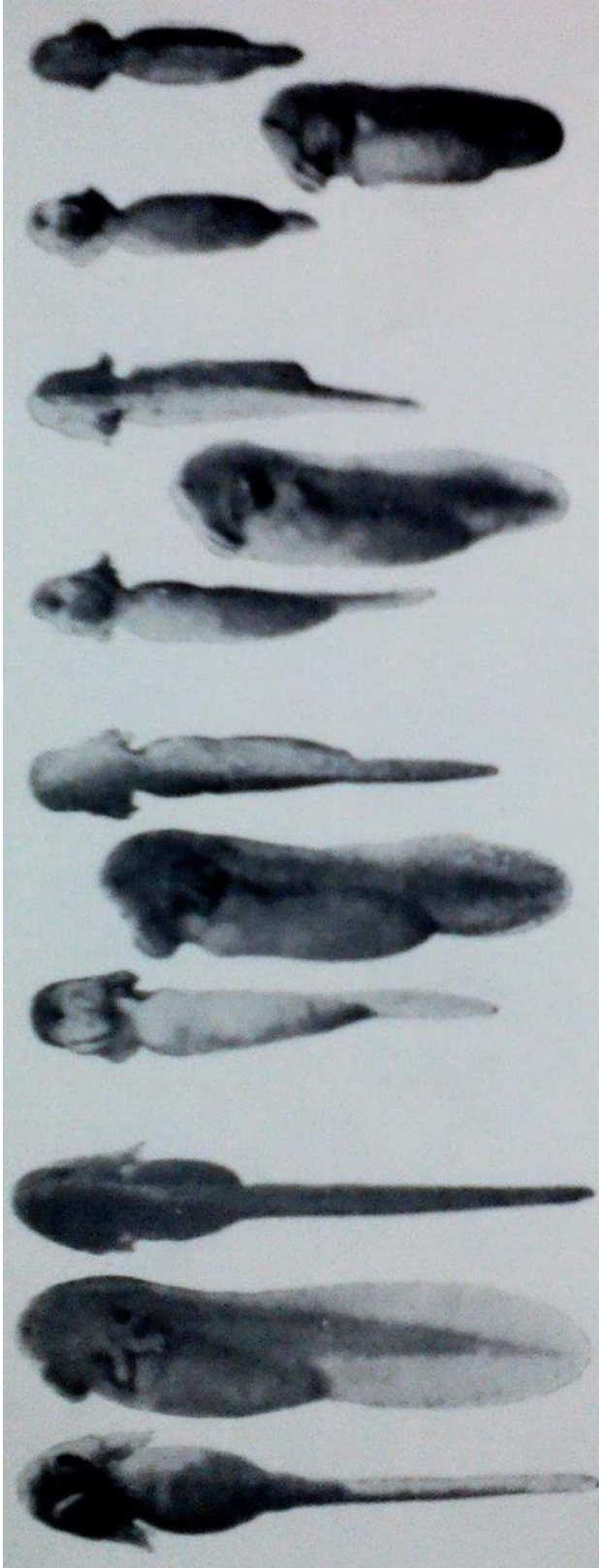
**Estadio 13 44 horas
PLACA NEURAL**

**Estadio 14 54 horas
SURCO NEURAL**

**Estadio 15 59 horas
ROTACIÓN**

**Estadio 16 64 horas
TUBO NEURAL**

**Estadio 17 70 horas
BROTE CAUDAL**

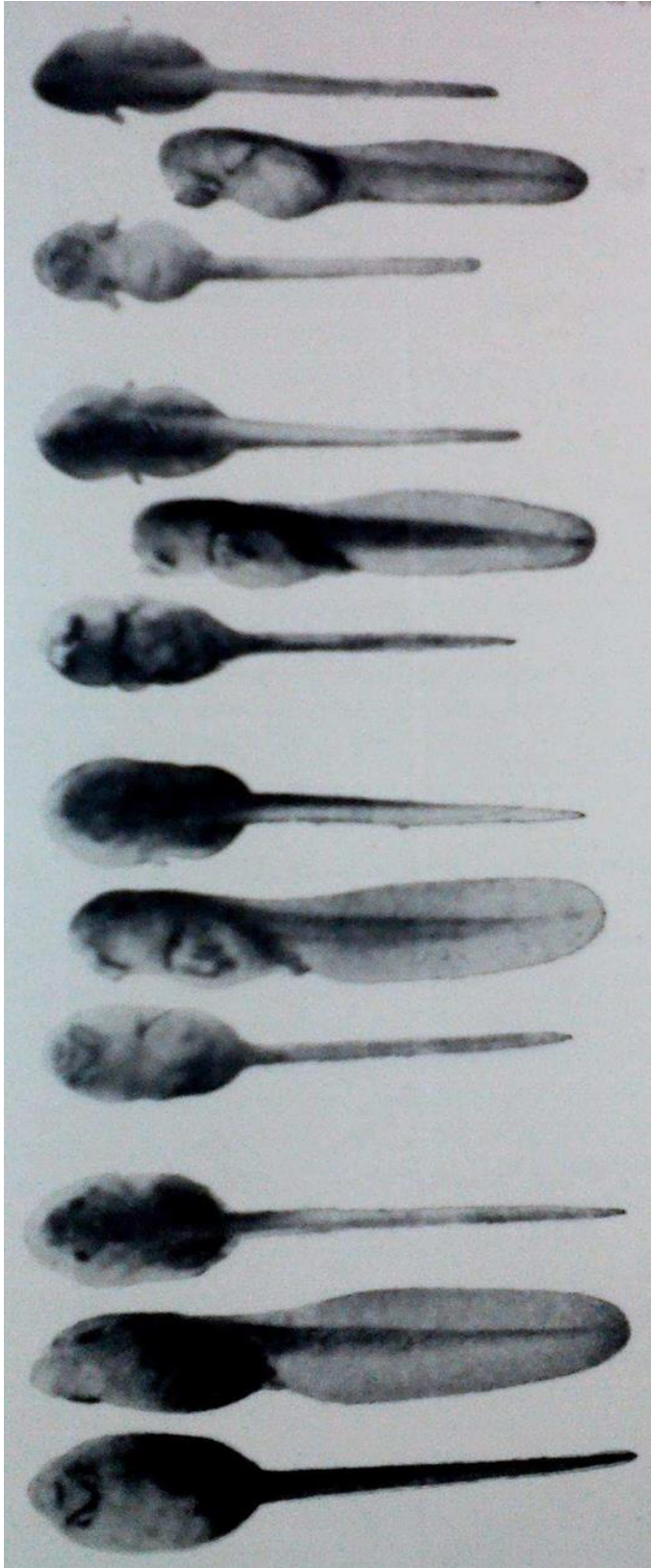


Estadio 18 4 días
RESPUESTA MUSCULAR
(3,5 mm)

Estadio 19 5 días
LATIDO CARDÍACO
(5 mm)

Estadio 20 5 1/2 días
CIRCULACIÓN BRANQUIAL
(5,5 mm)

Estadio 21 6 1/2 días
BOCA ABIERTA
(7 mm)



Estadio 22 7 1/2 días
CIRCULACIÓN
EN LA ALETA DE LA COLA
(7,5 mm)

Estadio 23 8 días
PLIEGUE OPERCULAR
(8 mm)

Estadio 24 9 1/2 días
OPÉRCULO CERRADO
EN LA DERECHA
(9 mm)

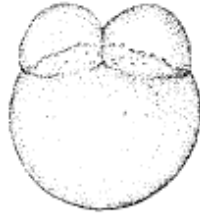
Estadio 25 11 días
OPÉRCULO COMPLETO
(10 mm)

Anexo II

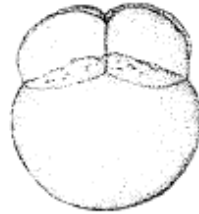
Estadíos del desarrollo embrionario de *danio rerio* (Kimmel, Ballard, Kimmel, Ullmann, & Schilling, 1995)



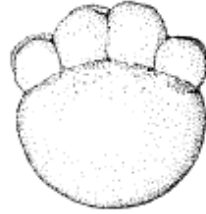
1-cell
0.2 h



2-cell
0.75 h



4-cell
1 h



8-cell
1.25 h



16-cell
1.5 h



32-cell
1.75 h



64-cell
2 h



128-cell
2.25 h



256-cell
2.5 h



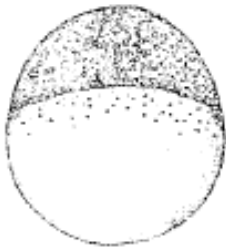
512-cell
2.75 h



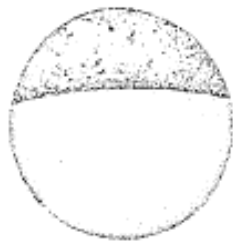
1k-cell
3 h



high
3.3 h



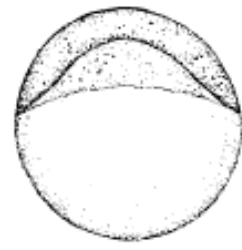
oblong
3.7 h



sphere
4 h



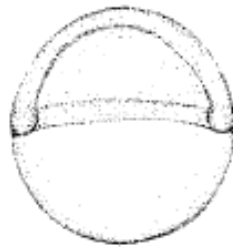
dome
4.3 h



30%-epiboly
4.7 h



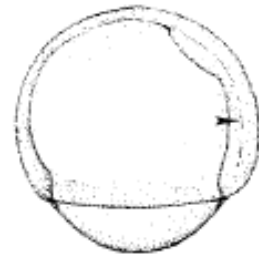
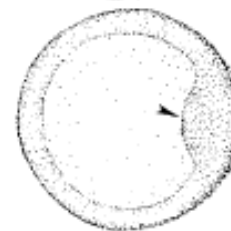
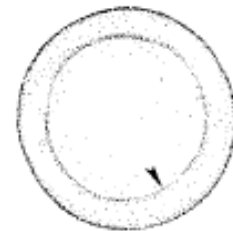
50%-epiboly
5.3 h



germ ring
5.7 h



shield
6 h



75%-epiboly
8 h



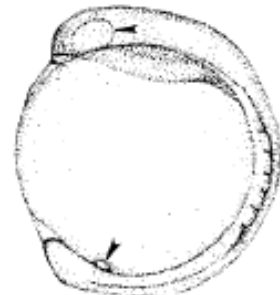
90%-epiboly
9 h



bud
10 h



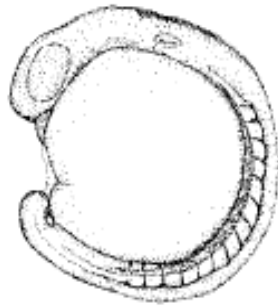
3-somite
11 h



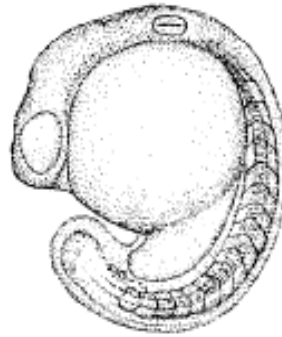
6-somite
12 h



10-somite
14 h



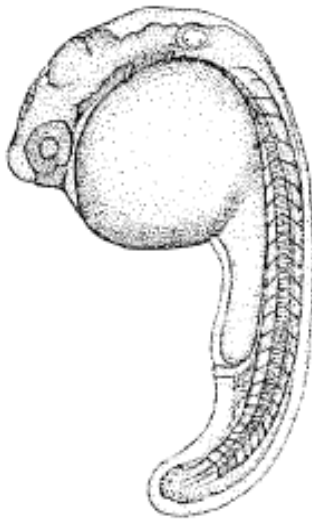
14-somite
16 h



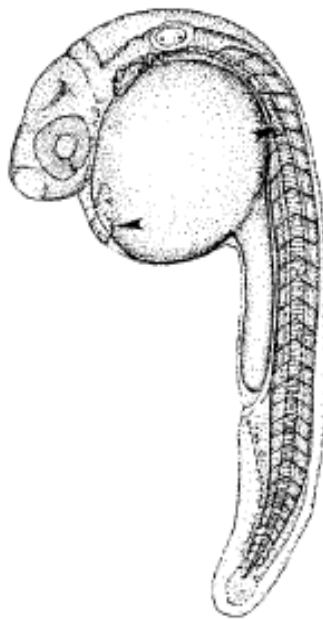
18-somite
18 h



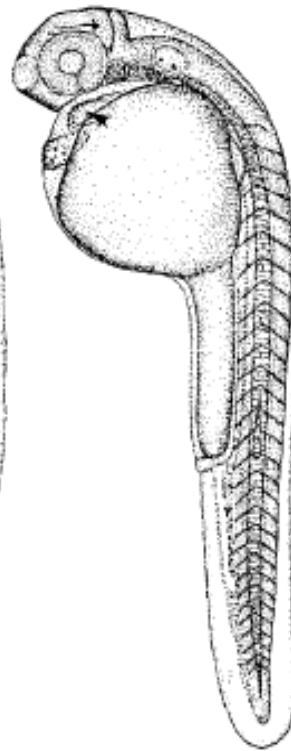
21-somite
19.5 h



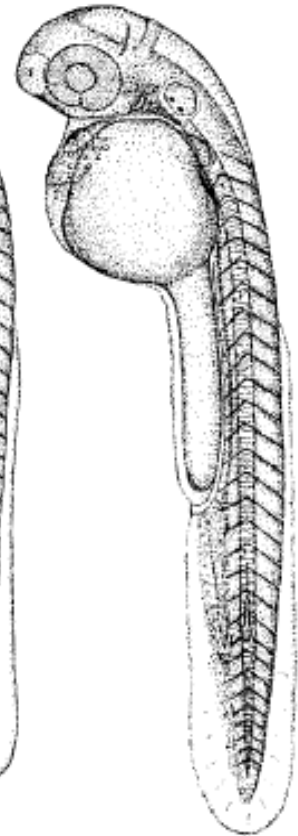
26-somite
22 h



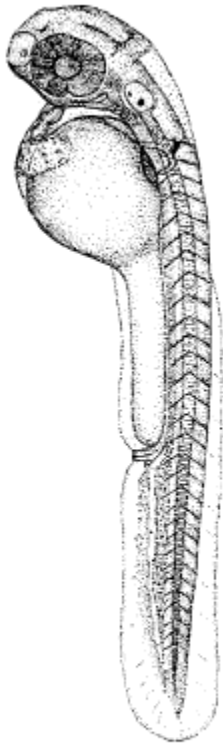
prim-6
25 h



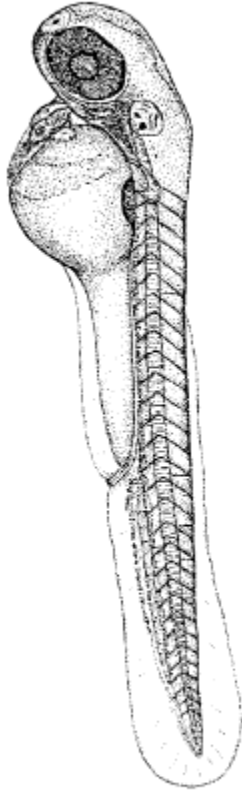
prim-16
31 h



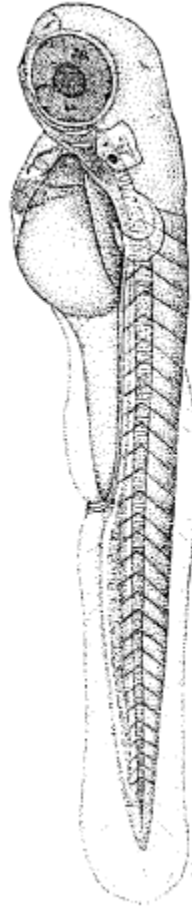
prim-22
35 h



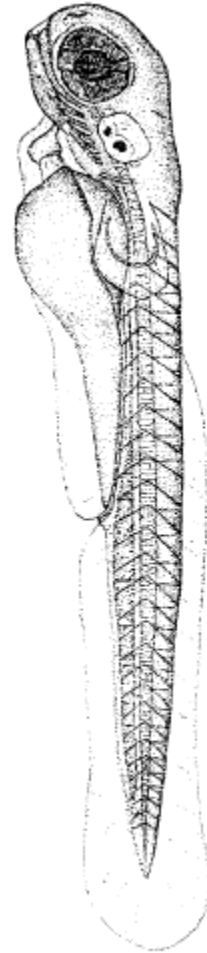
high pec
42 h



long pec
48 h



pec fin
60 h



protruding
mouth
72 h



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Brieva, C. (2018). Caracterización y análisis multidisciplinario de la información hidrológicas en cuencas. Ministerio de Agroindustria, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, San Rafael, Mendoza.
- Calvo, G., Cipponeri, M., Salvioli, M., Trovatto, M., & Alvares, P. (2014). Análisis multitemporal del uso efectivo del territorio en la cuenca del Arroyo Las Conchitas-Plátanos. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ingeniería, Departamento de Hidráulica, Unidad de Investigación, Desarrollo, Extensión y Transferencia Gestión Ambiental (UIDET- Gestión Ambiental- FI UNLP).
- Carson, R. (1962). Primavera Silenciosa. Barcelona: Crítica.
- Collins, J., & Storfer, A. (2003). Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions*(9), 89-98.
- Del Conte, E., & Sirlin, L. (1951). The first stages of *Bufo arenarum* development. *Acta Zoológica Lilloana*(12), 495-499.
- Echeverría, D., & Fiorito de Lopez, L. (1981). Estadios de la metamorfosis en *Bufo Arenarum* (Anura). *Physis, Sección B* 40(98), 15-23.
- Espinoza, M. B. (2016). El Pez Cebra: una herramienta en educación. (U. d.-F. Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales (INBA-CONICET), Ed.) *Revista de Educación en Biología*, 19(1), 11-18.
- Gali, R. M. (2017). Cambios a nivel epigenético y proteómico en pez cebra en respuesta a la infección con virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV). Universidad de Miguel Hernandez, Alicante, España.
- Giannuzzi, L., & Godoy, D. (2006). Contaminación ambiental con Plomo en el Barrio La Rotonda-Florencio Varela. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ingeniería- Unidad de Investigación, Desarrollo y Docencia Gestión Ambiental, La Plata.
- Hartwell, H., Welsh, J., & Ollivier, L. (1998). Stream amphibians as indicators of ecosystem stress - A case study from californix redwoods. *Ecological Applicationis*, 8(4), 1118-1132.
- Herkovits, J. (2015). Ecotoxicología: Una desición necesaria para el manejo sustentable de cuencas hídricas. *Ingeniería Sanitaria y Ambiental*(125), 10-21.

- Herkovits, J., & Perez-Coll, C. (Enero/Febrero/Marzo/Abril de 1999). Bioensayos para test de toxicidad con embriones de anfibio ("ANFITOX"). Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental - AIDIS Argentina(42-43), 24-30 (Parte 1); 50-55 (Parte 2).
- Herkovits, J., Pérez-Coll, C., & Herkovits, F. (2002). Ecotoxicological studies of environmental samples from Buenos Aires area using a standardized amphibian embryo toxicity test (AMPHITOX). *Environmental Pollution*(116), 177-183.
- Herkovits, J., Rodriguez, C., Boyle, T., Servant, R., Pérez Coll, C., Gomez, N., . . . Cordero, M. (2003). Estudio ecotoxicológico: relevamiento de la biota y parámetros físico-químicos en el arroyo Las Conchitas. *Salud Ambiental y Humana: una visión holística*, 50-53. doi:ISBN 13:978-987-05-1059-1
- Hurtado, M. A., Gimenez, J., Cabral, M. G., Da Silva, M., Camilión, M. C., Sanchez, C. A., . . . Martinez, O. R. (2006). Suelos del partido de Berazategui como base para el planeamiento ambiental y ordenamiento territorial. Informe Final (Contrato de obra CFI – Expediente 69610001), Universidad Nacional de La Plata, Instituto de geomorfología y suelos; Facultad de Ciencias Naturales y Museo, La Plata.
- INA. (2011). Evaluación de la calidad del agua en la franja costera sur del Río de La Plata mediante modelación numérica. Informe LHA 02-1.207-11, Instituto Nacional del Agua, Laboratorio de hidráulica, Ezeiza.
- INDEC. (2010). Censo Nacional de Población y Vivienda. Obtenido de www.indec.gov.ar: <https://www.indec.gov.ar/indec/web/Nivel4-CensoProvincia-3-999-06-091-2010>
- IRAM 29012-10. (1995). Medio ambiente. Calidad del agua. Muestreo de aguas residuales. Obtenido de <http://catalogo.iram.org.ar/signven2/busciram01.aspx>
- IUCN. (2019). Red List of Threatened Species, 2019-3. Recuperado el 28 de Enero de 2020, de <https://www.iucnredlist.org>.
- Kimmel, C., Ballard, W., Kimmel, S., Ullmann, B., & Schilling, T. (1995). Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. (U. o. Institute of Neuroscience, Ed.) *DEVELOPMENTAL DYNAMICS*(203), 253-310.
- Lajmanovich, R. (2015). Ecotoxicología, un desafío del presente para aseguar el futuro. *Revista Bioproyección*, 6-7.
- Ley 11.459. (1993). Radiación y Habilitación de Industrias.

- Lozada García, J. A., Sanchez Palmeros, B., Ramirez Benitez, M. D., & Fernandez, M. D. (Enero-Abril de 2012). El pez Cebra: una especie modelo. *La Ciencia y el Hombre*, XXV(1), 1-3. doi:ISSN:0187-8786
- OMS. (2018). ¿La herencia de un mundo sostenible? Atlas sobre salud infantil y medio ambiente. Ginebra, Suiza: Organización Mundial de la Salud. doi:ISBN 978-92-4-351177-1
- OPDS. (1996). Organismo Provincial para el Desarrollo Sostenible.
- Ossama, N. A. (2011). Biomarcadores de contaminación acuática; Estudios en los ríos Lujan y Reconquista. Universidad de Buenos Aires: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Pérez Coll, C., Herkovits, J., & Salibián, A. (1986). Teratogenic effects of cadmium on bufo arenarum during gastrulation. *Experientia*, 42, 1174-1176.
- Pisanó, A. (1956). Efficienza funzionale e struttura dell' ipofisi di anfibio. *Arch Zool Ital.*(42), 221-227.
- Pisano, A. (1977). *Temas de Embriología*. Buenos Aires, Argentina: Fundación para la Educación, la Ciencia y la Cultura.
- Pisanó, A. (1977). *Tópicos de Embriología*. Fundación para la Educación, la Ciencia y la Cultura.
- PNUMA. (2014). El Convenio de Minamata sobre el Mercurio y su impacto en la región de América Latina y el Caribe. Webinteligente.
- Ramirez López, J. L. (2015). Alternativas de Manejo Sustentable de la Subcuenca del Río Pitura; provincia de Imbabura, Ecuador. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, La Plata.
- Relyea, R., Schoeppner, N., & Horveman, J. (2005). Pesticides and amphibians: The importance of community context. *Ecological Applications*, 15(4), 1125–1134.
- Rocha, A., Ruiz, S., & Coll, J. (2002). Método sencillo para reproducir huevos embrionados de pez cebra. *Investigación Agrararia: Producción y sanidad animales*, 17(1-2), 93-102. doi:ISSN 0213-5035
- Salibián. (2015). Reflexiones acerca de la ecotoxicología que viene. (A. A. (AAPC), Ed.) *Revista Ciencia e Investigación*(Tomo 65. Nro. 2), 82-83.
- Salvioli, M., Colli, G., Cipponeri, M., & Calvo, G. (2012). Gestión de cuencas; análisis comparativo en función de la calidad del agua y usos del suelo en dos pequeñas cuencas urbanas. Universidad Nacional de La Plata- Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ingeniería-

Unidad de Investigación, Desarrollo y Docencia Gestión Ambiental. Facultad de Agronomía, La PLata.

Scott, g. (2005). Biología del desarrollo. Madrid, España: Ed. Médica Panamericana.

Svartz, G. (2014). Evaluación de la toxicidad del endosulfán, la cipermetrina y un fungicida de uso comercial, solos y en mezclas sobre el desarrollo temprano de *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura: Bufonidae). Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Swallow, B. M., Johnson, N. L., & Meinzen-Dick, R. S. (2001). Working with people for watershed management. *Water Policy* 3.

USEPA. (1988). Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos.

USEPA. (1991). Technical support document for water quality-based toxics control. (U.S Environmental Protection Agency). Washington, DC: Environmental Protection Agency: EPA 505-2-90-001.

Varela Al Día. (14 de febrero de 2012). Diputados bonaerenses denunciaron penalmente a Secretaría de Política Ambiental de Florencio Varela. Obtenido de <http://varelaaldia.com.ar/viejo/archivos/articulo/399/diputados-bonaerenses-denunciaron-penalmente-a-secretaria-de-politica-ambiental-suarez-arocena>

Vive la Naturaleza. (30 de Enero de 2020). www.vivelanaturaleza.com. Obtenido de <http://www.vivelanaturaleza.com/especie-peza-cebra-danio-rerio.php>

Yacuzzi, E. (2008). Chisso Corporation y la enfermedad de Minamata. Universidad del CEMA, Área; casos de negocios. Buenos Aires, Argentina: Nro. 391.