



# Influencia de las prácticas agropecuarias sobre cursos de agua de Patagonia: empleo de macroinvertebrados y sistema de defensa a múltiples agentes xenobióticos (MXR) como biomonitores

**Lic. Cristina Natalia Horak**

Trabajo de tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Naturales

Director de tesis: **Dra. Yanina Assef**

Director de tesis: **Dra. Nora Gómez**

Año: **2019**

Centro de Investigación  
de Montaña y Estepa  
Patagónicas  
CONICET - UNPSJB



C I E M E P



Facultad de Ciencias Naturales  
y Museo  
Universidad Nacional  
de La Plata

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

**“Influencia de las prácticas agropecuarias sobre  
cursos de agua de Patagonia: empleo de  
macroinvertebrados y sistema de defensa a múltiples  
agentes xenobióticos (MXR) como biomonitores”**

**ASPIRANTE:** Lic. Cristina Natalia Horak.

**DIRECTOR:** Dra. Yanina Andrea Assef

**DIRECTOR:** Dra. Nora Gómez

**LUGAR DE TRABAJO:** CIEMEP - Centro de Investigaciones Esquel de Montaña y  
Estepa Patagónica. CONICET-UNPSJB. Sarmiento 849. CP 9200 – Esquel – Chubut.



**Año 2019**

*Dedicada a mi familia...  
Y en especial a mi compañero de estudios y  
aventuras... a mi hijo, Sebastián.*



## AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer enormemente a mi directora de tesis, la Dra. Yanina Assef, por su acompañamiento a lo largo de los últimos años de mi carrera y durante todo mi doctorado. Su gran capacidad para enseñar y su calidez humana han sido de gran importancia para mi formación. Gracias por ser siempre ejemplo de sinceridad, honestidad y esfuerzo. Gracias por la confianza que depositas en mí, por apostar a mí y a mi carrera. Quiero agradecer también a la Dra. María Laura Miserendino por su permanente tutela, por estar siempre para ayudarme a resolver problemas, acompañar y fortalecer proyectos. Gracias por tus comentarios y correcciones siempre atentas y motivadoras. Quiero agradecer también a la Dra. Nora Gómez, quien a pesar de la distancia siempre supo tener un comentario certero para enriquecer mi formación. Gracias Nora por tu permanente y excelente predisposición a lo largo de todos estos años.

Quiero agradecer también a la Dra. Adriana Kutschker, la Dra. Marta Grech, la Dra. Cecilia Brand, el Dr. Miguel Archangelsky y el Lic. Nicolás Martínez Román por su colaboración en la determinación taxonómica de distintos grupos así como sus aportes en diferentes etapas del trabajo.

Seguidamente quiero agradecer a mis compañeros del CIEMEP, becarios, investigadores y técnicos quienes han ayudado a mantener el ánimo y el buen humor durante el desarrollo de todo este trabajo. Gracias por las campañas, los mates, las tradiciones y las risas compartidas (y los after office!).

Gracias a mis amigos fuera del trabajo, quienes siempre supieron tener un oído paciente para escuchar y aguantar mis momentos de estrés. Gracias por la compañía, las salidas y las escapadas que ayudaron a mantener la “cordura” durante estos años.

Quiero agradecer a mi familia, quienes han sido y son siempre mi gran compañía y sostén. Gracias por el apoyo incondicional que siempre me han brindado. Gracias a Bibi, mi hermana, por estar siempre cerca y atenta a pesar de la distancia. Gracias por tu sinceridad permanente, por ser esa persona de confianza que me ayuda a ver aquello que no siempre quiero escuchar. Gracias Papá por ayudarme con cada proyecto que emprendo por ser el creador de tantas ocurrencias y pensador de tantas estrategias facilitadoras de tareas. Gracias Ma por la paciencia aún en mis momentos más tensos, gracias por ser, sin lugar a dudas mi mejor maestra. Gracias a los dos por ser un gran

ejemplo de trabajo, esfuerzo y dedicación en las tareas que uno emprende y con las que se compromete.

Finalmente, quiero agradecer a mi compañero de carrera y quién es casi tan responsable de este trabajo como yo, gracias Hijo, Sebastián.

## ÍNDICE

RESUMEN	9
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN	18
1.1 Calidad del agua y usos de la tierra	18
1.2 Desarrollo agropecuario en Argentina y en la región patagónica	18
1.3 Actividades productivas en cuencas del noroeste del Chubut y calidad del agua	19
1.3.1 Actividades de engorde de animales intensivas y semi-intensivas	20
1.3.2 Cultivo de pasturas y forrajes	22
1.4 Influencia del uso de la tierra sobre la integridad ecológica de ríos y arroyos de Patagonia: antecedentes	23
1.5 Biomonitorio	24
1.5.1 Mecanismos de detoxificación en organismos acuáticos: sistema de resistencia a múltiples xenobióticos (MXR) como biomarcadores de exposición.	25
1.5.2 Macroinvertebrados bentónicos: bioindicadores de calidad de agua y degradación ambiental.	30
1.6 Contaminantes de ecosistemas acuáticos asociados a la actividad Agropecuaria	31
Medicamentos de uso veterinario	32
Sustancias asociadas a la producción de especies forrajeras y pasturas	33
1.6.1 Contaminantes de ecosistemas acuáticos asociados a la actividad agropecuaria y su relación con el sistema MXR	34
MXR en organismos acuáticos de Patagonia	34
1.6.2 Contaminantes de ecosistemas acuáticos asociados a la actividad agropecuaria y su relación con la biodiversidad de macroinvertebrados bentónicos	36
1.7 Legislación	37
1.8 Justificación	38
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	41
2.1 Hipótesis	41
2.2 Objetivos	41

2.2.1	Objetivo General	41
2.2.2	Objetivos específicos	41
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	45
3.1	Área de estudio	45
3.2	Selección de los sitios	46
3.3	Caracterización ambiental	56
3.4	Índice de calidad de hábitat e integridad del ecosistema de ribera	58
3.5	Toma de muestras de macroinvertebrados	59
3.6	Actividad MXR	60
3.6.1	Ensayo de bioacumulación de Rodamina B (RB)	61
3.6.2	Depuración	63
3.6.3	Ensayos de exposición a compuestos tóxicos <i>in vitro</i>	63
3.7	Evaluación de atributos comunitarios y cálculo de métricas	64
3.8	Análisis estadístico	66
4.	RESULTADOS	71
4.1	Caracterización ambiental de los sitios de estudio	71
4.2	Composición y cobertura de la vegetación acuática	81
4.3	Composición de la vegetación ribereña	82
4.4	Índice de calidad de hábitat (ICH) e índice de calidad de ribera (QBRp)	85
4.5	Actividad MXR	87
4.5.1	Caracterización del sistema MXR en moluscos <i>Chilina dombeiana</i> y <i>Physa acuta</i>	87
	Evaluación de los tiempos de exposición a RB y verapamilo	87
	Ensayo de bioacumulación de rodamina N a distintas concentraciones	89
	Ensayo de bioacumulación de RB en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor verapamilo	91
4.5.2	Actividad MXR evaluada en organismos acuáticos presentes en los sitios de muestreo asociados a prácticas agropecuarias	92
	Actividad MXR de <i>Chilina dombeiana</i> en campo	92
	Actividad MXR de <i>Physa acuta</i> en campo	94
	Actividad MXR de <i>Physa acuta</i> en sitios con distintos tipos de disturbio	96
4.5.3	Actividad MXR <i>in vitro</i>	98
	Actividad MXR <i>in vitro</i> de <i>Chilina dombeiana</i> expuestos a glifosato	99

	Actividad MXR in vitro de <i>Chilina dombeiana</i> expuestos a ivermectina	101
	Actividad MXR in vitro de <i>Physa acuta</i> expuestos a glifosato	102
	Actividad MXR in vitro de <i>Physa acuta</i> expuestos a ivermectina	103
4.6	Atributos de la comunidad de macroinvertebrados bentónicos	104
4.6.1	Composición taxonómica	104
4.6.2	Densidad de macroinvertebrados	109
4.6.3	Estructura trófica por sitio	113
4.6.4	Análisis de métricas: macroinvertebrados y respuesta al uso de la tierra	115
4.7	Influencia de las condiciones ambientales sobre la comunidad de macroinvertebrados	119
4.7.1	Análisis de correspondencias canónicas	119
4.7.2	Análisis de correlación	122
4.7.3	Modelos lineares generalizados	123
5.	DISCUSIÓN	136
	Características ambientales de arroyos de piedemonte en relación al uso agropecuario	136
	Integridad de los ecosistemas acuáticos estudiados	142
	Actividad MXR y puesta a punto de la técnica de bioacumulación en <i>Chilina dombeiana</i> y <i>Physa acuta</i>	144
	Actividad MXR evaluada en los organismos presentes en los sitios de estudio	145
	Actividad MXR in vitro	150
	Efectos de las actividades agropecuarias sobre las comunidades de macroinvertebrados	155
	Prácticas de manejo para reducir el impacto de la ganadería	160
6.	CONCLUSIÓN	164
7.	BIBLIOGRAFÍA	168

## RESUMEN

La calidad de los ecosistemas dulceacuícolas está determinada por las condiciones del agua y también por la integridad de los ecosistemas de ribera, debido a la gran conectividad que existe entre estos ambientes. Los disturbios que el hombre produce en las riberas pueden conducir a la degradación de estos ecosistemas y a la pérdida de los servicios que estos brindan. En las últimas décadas, actividades como la producción de pasturas y hortalizas, así como el desarrollo de la ganadería con formatos intensivos y semi-intensivos (engorde de ganado en confinamiento), asociadas a ríos y arroyos de piedemonte, se han convertido en prácticas muy difundidas en el noroeste del Chubut. Los efectos que estas actividades producen sobre los cursos de agua son materia de interés mundial. Entre ellos se incluyen cambios en las condiciones fisicoquímicas del agua, enriquecimiento en nutrientes y la llegada al agua de compuestos como metales, fármacos y pesticidas. Estas alteraciones deterioran el recurso hídrico y perjudican a la biota que allí se desarrolla. Muchos organismos acuáticos poseen mecanismos que les permiten habitar ambientes contaminados. El sistema de resistencia a múltiples xenobióticos (MXR), asociado a la expresión de un conjunto de proteínas de membrana (entre ellas la P-glicoproteína o P-gp), constituye uno de estos mecanismos. Éste actúa como una primera línea de defensa, transportando al exterior de las células las sustancias que puedan resultar tóxicas para el organismo. Como este sistema puede ser modulado por numerosos compuestos, se lo ha propuesto como un posible biomarcador en el testeo ecotoxicológico.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la influencia de distintas prácticas agropecuarias sobre los cursos de agua, utilizando ensambles de macroinvertebrados bentónicos como biomonitores, en distintos niveles de organización biológica. Se evaluó la integridad ecológica de los arroyos teniendo en cuenta las características fisicoquímicas del agua, los efectos de estas actividades sobre los ensambles de macroinvertebrados, y también la actividad del sistema de detoxificación MXR como biomarcador en organismos presentes en los sitios de muestreo. Además, se exploró la respuesta de este sistema *in vitro* para el testeo de contaminantes acuáticos asociados a estas prácticas productivas.

Para esto, se seleccionaron tres arroyos, denominados Ruca, Enna e Ingram, ubicados en un área de transición en la zona de piedemonte (NO, Chubut, Argentina). Se ubicaron tres sitios de muestreo en el arroyo Ruca (R1, R2, R3) y cuatro en los

arroyos Enna (E1, E2, E3, E4) e Ingram (I1, I2, I3, I4). Los sitios numerados como 1 (R1, E1, I1) fueron definidos como sitios de referencia ya que no estuvieron asociados a las prácticas intensivas o semi-intensivas evaluadas, y presentaron las mejores condiciones de cada sistema. En los 11 sitios, se determinaron bimensualmente las características fisicoquímicas del agua, (entre julio 2015 – abril 2016). Se tomaron muestras de agua para estudios bacteriológicos en los muestreos de agosto y noviembre 2015. Se realizaron análisis de pigmentos fotosintéticos para estimar la biomasa de perifiton presente (en tres oportunidades en agosto y noviembre 2015 y abril 2016). Se registró la riqueza de especies y la cobertura porcentual de macrófitas en cada sitio. Para evaluar los cambios producidos por las actividades agropecuarias en las condiciones de los arroyos y sus riberas se utilizaron dos índices adaptados para ambientes de la cordillera patagónica: el índice de calidad de hábitat (ICH) o medida de heterogeneidad ambiental y el índice de calidad de ribera (QBRp) que evalúa la complejidad y los atributos de la vegetación de la ribera. Se utilizaron macroinvertebrados como bioindicadores de la calidad del agua en dos niveles de organización: a nivel bioquímico, mediante el uso del sistema MXR, y a nivel de comunidad biológica, evaluando las características de los ensambles de macroinvertebrados bentónicos. Se utilizaron moluscos de las especies *Chilina dombeiana* y *Physa acuta* para evaluar la actividad del sistema MXR mediante ensayos de bioacumulación del sustrato fluorescente rodamina B (RB) en presencia y ausencia de un inhibidor específico de la P-gp (verapamilo). Se evaluó también la capacidad del Glifosato y la Ivermectina de inducir el sistema MXR en ambas especies. Para esto, los organismos fueron separados en grupos y expuestos a concentraciones crecientes de Glifosato (formulado comercial y principio activo) e Ivermectina durante períodos de 4 días y 10 días. Posteriormente, se realizaron los ensayos de bioacumulación de RB para evaluar la presencia de cambios en la actividad MXR.

Se realizaron muestreos cuantitativos de la comunidad de macroinvertebrados bentónicos en dos momentos contrastantes con respecto a las condiciones hidrológicas: aguas altas (agosto 2015) y aguas bajas (octubre-noviembre 2015). Estos muestreos se realizaron en 9 de los 11 sitios antes mencionados, debido a que los sitios E3 y E4 se localizaron en una zona de humedales conectados (datos no comparables) por lo que no se monitoreó el bentos. En cada visita se colectaron seis muestras de macroinvertebrados con red Surber, tres en correderas y tres en pozones en segmentos

de arroyo de 50 a 100 m. El material fue fijado *in situ* y posteriormente separado, identificado hasta el menor nivel taxonómico posible, y contabilizado en el laboratorio. Se calculó la riqueza taxonómica, la densidad total de individuos, la densidad relativa de cada grupo faunístico y diversidad ( $H'$ ). Además se analizó la estructura trófica (grupos funcionales). Finalmente se efectuó una evaluación y selección de diferentes métricas de macroinvertebrados en relación a su respuesta frente a los disturbios registrados.

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para examinar la variación de las características físicas, químicas y biológicas de los sitios estudiados (11 sitios). Para evaluar si existieron diferencias ambientales entre los sitios se realizaron análisis no paramétricos (ANOVA Kruskal-Wallis). Para identificar diferencias en la actividad MXR entre los organismos de los distintos sitios de estudio, y en los organismos expuestos a Glifosato e Ivermectina, se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) y test t de Student. Se examinó la relación entre las asociaciones de los ensambles de macroinvertebrados o métricos seleccionados y las variables ambientales, mediante un análisis de correspondencias canónicas (ACC) y correlaciones no paramétricas de Spearman. Finalmente se analizó la capacidad predictora de las variables ambientales sobre los métricos basados en los ensambles de macroinvertebrados utilizando modelos lineales generalizados de efectos mixtos.

Las características ambientales registradas mostraron que los sitios afectados por actividades agropecuarias presentaron una degradación moderada de la calidad del agua. Los sitios asociados a ganadería intensiva y semi-intensiva exhibieron un aumento en las concentraciones de nutrientes ( $\text{NH}_4^+$ ), conductividad eléctrica, TSS y una disminución en el oxígeno disuelto. Asimismo, se registró, un aumento en el número de *E. coli* y en la concentración de clorofila *a* epilítica, lo que en conjunto podría estar indicando un proceso de eutrofización de estos ambientes. Si bien los disturbios observados fueron moderados, los ensambles de macroinvertebrados bentónicos respondieron en forma significativa a los mismos.

La actividad MXR evaluada en moluscos presentes en los sitios de estudio resultó poco sensible a los disturbios registrados. Sin embargo, este biomarcador mostró una respuesta diferencial al ser evaluado en organismos provenientes de sitios más disturbados, como aquellos afectados por desechos urbanos. Además se pudo comprobar que sustancias como el Glifosato y la Ivermectina, utilizadas en las prácticas agropecuarias de la región, son capaces de inducir *in vitro* la actividad de este sistema.

Es por esto que de incrementarse el nivel de disturbio o de aumentar el ingreso de estas sustancias en los ambientes acuáticos, este biomarcador podría resultar útil para generar alertas tempranas de cambios que podrían resultar riesgosos para la biota del lugar.

La comunidad de macroinvertebrados bentónicos mostró una alta riqueza taxonómica (111 taxones), distribuida en cinco Phyla. Los sitios asociados a actividades ganaderas intensivas mostraron una disminución del número de especies de los grupos sensibles como Plecoptera y un aumento de los tolerantes como Annelida y Diptera. Se observó un aumento de la contribución del grupo colectores-recolectores, así como una disminución del grupo raspadores en sitios con alteración de zonas de riberas por la presencia de ganado. Esto podría estar asociado al empobrecimiento en la calidad y cantidad de alimento, así como a una mayor deposición de sedimentos finos en el lecho de los arroyos. Los ensambles de macroinvertebrados respondieron consistentemente a los disturbios evaluados.

Los atributos de los ensambles se correlacionaron con los factores ambientales antes mencionados, que reflejaron procesos de degradación. Métricas como riqueza de EPT y el número de familias de insectos mostraron una asociación lineal con respecto a la concentración de amonio en los sitios de estudio sugiriendo efectos tóxicos de esta forma de nitrógeno. Estas métricas, basadas en datos cualitativos (de cálculo rápido), proporcionan información útil sobre las condiciones ecológicas predominantes en los arroyos estudiados.

Los cambios producidos por las actividades agropecuarias que se desarrollan en cuencas del noroeste del Chubut afectan la calidad del agua de los arroyos. Los disturbios resultaron moderados en comparación a otros (ej. urbanización), anticipando la importancia de generar estrategias de monitoreo y mitigación tendientes a proteger la integridad de los ecosistemas y de los servicios que estos brindan. La información aquí generada, podría contribuir a minimizar los daños ambientales. El trabajo en conjunto con los productores y los responsables de gestión es vital para generar estrategias para la conservación de los recursos acuáticos de Patagonia.

## ABSTRACT

The quality of freshwater ecosystems is determined by water conditions and also by the integrity of riverbank ecosystems, due to the great connectivity that exists between these environments. The man-made disturbance of riverbanks can lead to the degradation of these ecosystems and the loss of the services they provide. In recent decades, activities such as pasture and crop production, as well as livestock breeding using intensive and semi-intensive methods (confined animal production systems), have become widespread in the northwest of Chubut province, where they are associated with the rivers and streams of the piedmont. The effects that these activities have on water courses are of global concern. These include changes in water physicochemical conditions nutrient enrichment and the introduction of compounds such as metals, drugs and pesticides into the water. These alterations deteriorate the water resource and damage the biota that develops there. Many aquatic organisms have mechanisms that allow them to inhabit contaminated environments. The multiple xenobiotic resistance system (MXR), associated with the expression of a set of membrane proteins (including P-glycoprotein or P-gp), constitutes one of these mechanisms. This acts as a first line of defence, expelling from the cells substances that can be toxic to the organism. As this system can be modulated by numerous compounds, it has been proposed as a possible biomarker of ecotoxicological testing.

The present work aims to evaluate the influence of different agricultural practices on water courses, using benthic macroinvertebrate as biomonitors, at different levels of biological organization. The ecological integrity of streams was assessed taking into account physicochemical water features, the effects of these activities on macroinvertebrates assemblages, and the activity of the detoxification system MXR as a biomarker in organisms present in the sample sites. In addition, the response of this mechanism in an *in vitro* system for testing aquatic pollutants associated with these production practices was explored.

Three streams, namely Ruca, Enna and Ingram, located in a transition area in the piedmont area (NW, Chubut, Argentina) were selected. Three sampling sites were located at Ruca stream (R1, R2, R3), four at Enna stream (E1, E2, E3, E4) and four at Ingram stream (I1, I2, I3, I4). The sites numbered as 1 (R1, E1, and I1) were designated as reference sites because they were not associated with the intensive and semi-intensive practices being tested and therefore showed the best condition of each system.

At the 11 sites, water physicochemical features were determined bimonthly, (between July 2015 and April 2016). Water samples for bacteriological studies were taken twice, once during August and once during November 2015. Pigment analysis was performed in order to estimate periphyton biomass. Measurements were taken in August, November (2015) and April (2016). Species richness and percentage coverage of macrophytes were recorded at each site. For the evaluation of possible disturbance produced by agricultural activities on in-stream conditions and on the riparian corridors, two indexes commonly used for streams in the Patagonian mountain area were utilized: the habitat quality index (ICH) or measure of environmental heterogeneity and Riparian Quality Index (QBRp), which assesses the complexity and attributes of riverbank vegetation. Benthic macroinvertebrates were used as bioindicators of water quality at two biological organizational levels: at the biochemical level, through the use of MXR system, and at biological community level, evaluating benthic macroinvertebrate assembly characteristics. The mollusc species *Chilina dombeiana* and *Physa acuta* were used to assess the activity of the MXR system by bioaccumulation rhodamine B (RB) assay, in presence and absence of a specific P-gp inhibitor (verapamil). The ability of Glyphosate and Ivermectin to induce the MXR system in both species was also evaluated. For this, snails were separated into groups and exposed to increasing concentrations of glyphosate (commercial formula and active ingredient) and ivermectin for periods of 4 days and 10 days. Subsequently, RB bioaccumulation assays were performed to assess the presence of changes in MXR activity.

Benthic macroinvertebrate community quantitative sampling was carried out during two contrasting hydrological periods: high (August 2015) and low (October-November 2015) water. Samples were taken from 9 of the 11 sites mentioned above, because sites E3 and E4 were located in a connected wetlands area (non-comparable data) so benthos was not assessed. Samples were taken with a Surber sampler (0.09m<sup>2</sup>; 250µm pore size) from riffles (n=3) and pools (n=3) during each visit at each site, in stream segments of 50 to 100 m. Samples were fixed *in situ* and sorted in the laboratory, where macroinvertebrate taxa were counted and identified to the lowest possible taxonomic level. Total richness, total density, relative density of each faunal group and diversity ( $H'$ ) were calculated. In addition, trophic structure (functional feeding groups) was analysed. Finally, an evaluation and selection of different macroinvertebrate metrics was made in relation to their response to the recorded disturbances.

A principal component analysis (PCA) was performed to examine the variation of physical, chemical and biological features of 11 studied sites. To assess if there were environmental differences between sites, non-parametric analyses were performed (ANOVA Kruskal-Wallis). To identify differences in MXR activity between the organisms of the different study sites, and among the organisms exposed to different concentrations of Glyphosate and Ivermectin, analysis of variance (ANOVA) and Student's t-test were performed. The relationship between associations of macroinvertebrate assemblages or selected metrics and environmental variables was examined using a canonical correspondence analysis (CCA) and Spearman nonparametric correlations. Finally, effects of environmental predictors on invertebrate community metrics were analysed using generalized linear mixed-effects models.

Registered environmental variables showed that sites affected by agricultural activities presented moderate water quality degradation. Sites associated with intensive and semi-intensive livestock breeding management showed an increase in nutrient concentration (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), electrical conductivity and TSS, and a decrease in the level of dissolved oxygen. Moreover, there was an increase in the number of *E. coli* and in the concentration of epilithic chlorophyll *a*, which together could be indicative of the eutrophication of these environments. Although the observed disturbances were moderate, the benthic macroinvertebrate assemblies responded significantly to them.

The MXR activity evaluated in the molluscs present in the study sites was not found to be significantly sensitive to the disturbances recorded. However, this biomarker showed a differential response when evaluated in organisms from more disturbed sites, such as those affected by urban waste. In addition, it was found that substances such as Glyphosate and Ivermectin, which are used in agricultural practices in the region, are able to induce *in vitro* activity of this system. This is why, if the level of disturbance increases or the level of these substances entering aquatic environments increases, this biomarker could be useful for generating early warnings of changes that could be dangerous for the biota of the site.

The benthic macroinvertebrate community showed a high taxonomic richness (111 taxa), distributed in 5 Phyla. Sites associated with intensive livestock breeding showed a decrease in the number of species of sensitive groups such as Plecoptera and an increase in tolerant taxa such as Annelida and Diptera. An increase in the contribution of the collector gatherers group was observed, as well as a decrease in

scraper grazer groups in sites with alteration of riverbank areas due to the presence of cattle. This could be associated with impoverishment in the quality and quantity of food, as well as a greater deposition of fine sediments in the stream bed. The macroinvertebrate assemblies consistently responded to the disturbances evaluated.

Assembly attributes were correlated with the aforementioned environmental factors, which reflected degradation processes. Metrics such as EPT richness and number of insect families showed a linear association with ammonia concentration in the study sites, indicating the toxic nature of this form of nitrogen. These metrics, based on qualitative data (quick calculation), provide useful information about the predominant ecological conditions in the studied streams.

The changes produced by the agricultural activities that take place in watersheds in the northwest of Chubut province affect stream water quality. Registered disturbances were moderate compared to other land use types (e.g. urbanization), and the present study highlights the importance of generating monitoring and mitigation strategies aimed to protect the integrity of the ecosystems and the services they provide. The information generated here could contribute to minimizing environmental damage. Cooperation between producers and land managers is vital in order to generate future strategies for the conservation of water resources in Patagonia.



# INTRODUCCIÓN

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Calidad de agua y usos de la tierra**

Desde el origen a la desembocadura, los ecosistemas fluviales presentan condiciones ambientales en cambio continuo que dependen de diversos factores, como las características del cauce, el tipo de suelo, el clima, las variaciones estacionales del caudal, la vegetación ribereña, los aportes de nutrientes desde la vegetación y por infiltración desde los suelos circundantes, entre otros (Vanotte et al. 1980; Allan 1995). Dado que existen relaciones estrechas entre los ecosistemas acuáticos y terrestres, hay una fuerte preocupación a nivel mundial acerca de la integridad ecológica de ríos y arroyos por cambios en el uso de la tierra. Este fenómeno, que incluye la urbanización, la agricultura, la conversión de grandes áreas boscosas en pasturas, la deforestación, la actividad minera, entre otras, representa una amenaza real para la biodiversidad y la conservación de los ecosistemas lóticos (Allan y Castillo 2007; Miserendino et al. 2011). Estas actividades que se desarrollan en las márgenes de los cursos de agua pueden modificar la estructura del cauce, disminuir o eliminar la vegetación ribereña, aumentar la impermeabilidad del suelo, así como también generar un aporte de nutrientes, sedimentos e incluso diversas sustancias tóxicas. Estas últimas pueden llegar al cuerpo de agua no solo por descarga directa sino también por escorrentía e infiltración. Además, las prácticas de uso del suelo también pueden resultar en un aumento de la escorrentía superficial, con el consecuente incremento del caudal de los ríos en períodos de lluvias, afectando la condición y diversidad de hábitats dentro de los arroyos. Muchas veces la pérdida de la vegetación de ribera reduce el sombreado, modificando los patrones térmicos de los sistemas acuáticos (Moore y Richardson 2003; Richardson y Danehy 2007; Richardson y Sato 2015).

### **1.2. Desarrollo agropecuario en Argentina y en la región patagónica**

Históricamente, las producciones agrícolas y ganaderas han sido actividades clave para la economía argentina, lo que ha llevado a un desarrollo y transformación de las mismas de manera sostenida en las últimas décadas. La tecnología de producción de cultivos ha cambiado significativamente, reemplazando los sistemas de labranza tradicional por las técnicas de siembra directa, la incorporación del uso de agroquímicos

y la implementación de cultivos transgénicos. Por su parte, la producción de carne que era sustentada principalmente con pasturas naturales en modalidades extensivas, mayormente en la región pampeana, se ha ido intensificando con el desarrollo de sistemas de confinamiento y el corrimiento de estas actividades hacia zonas marginales (Oosterheld 2008; Rizzo et al. 2012). Esta situación se ha extendido a áreas extra pampeanas, incluyendo territorios no usados tradicionalmente para la producción ganadera como es el caso de la Patagonia. Históricamente, esta última fue una región de producción ovina y caprina, desarrollándose estas actividades en las zonas áridas y semiáridas de la estepa, asociadas a los grandes valles de los principales ríos de la región o a mallines y vegas que se encuentran distribuidos en el área. Sin embargo, en los últimos años los valles precordilleranos han comenzado a concentrar actividades de cría y engorde de ganado bovino con diferentes escalas y modalidades de producción (Iglesias et al. 2015). A pesar de que un bajo porcentaje de la producción de carne vacuna de Argentina (2% del inventario nacional de producción de carnes) se desarrolla en la ecorregión patagónica (Arelovich et al. 2011), existe una fuerte preocupación sobre cómo esta actividad podría afectar la sustentabilidad de los ecosistemas.

### **1.3. Actividades productivas en cuencas del noroeste de Chubut y calidad del agua.**

La zona del noroeste de Chubut tiene como una de sus principales actividades productivas a la ganadería, tanto bovina como ovina. El engorde de animales en forma intensiva o semi-intensiva asociado al cultivo de pasturas y forrajeras constituye una estrategia de producción válida y muestran un crecimiento sostenido en los últimos años (Bobadilla y Lexow 2012). En esta región, el desarrollo de pasturas y la cría de ganado se llevan a cabo en áreas en donde el acceso al agua se encuentra asegurado. Es por esta razón que dichas actividades se encuentran asociadas a cursos de agua, como surgentes, arroyos y ríos. Entre estos, los arroyos de piedemonte pueden ser particularmente vulnerables a la presencia de ganado porque usualmente son de pequeño tamaño y los animales no siempre pueden ser excluidos, especialmente en áreas donde esto significa inversiones importantes en alambrados e infraestructura (ej. dispositivos para el aprovisionamiento de agua) (Middleton 2013; Epele y Miserendino 2015) o las

legislaciones sobre manejo y protección son difíciles de cumplir (Nerbone y Vondradek 2001; Bossio et al. 2010).

### 1.3.1. Actividades de engorde de animales intensivas y semi-intensivas

En los últimos años en la región patagónica se han implementado diferentes modalidades de cría de animales. Como la demanda y la rentabilidad han aumentado, los productores han invertido en infraestructura para el acopio y la provisión de alimento (pequeños silos para granos, fardos, silo-bolsas, etc.) y los sistemas de producción de ganado en confinamiento están creciendo indudablemente (Iglesias et al. 2015). Esta tecnología puede encontrarse acoplada a un sistema pastoril constituyendo un modelo de producción “semi-intensivo” en el que aparecen las figuras de la suplementación estratégica, los corrales de recria y el encierre de terminación para la etapa final de crecimiento y desarrollo. De este modo el engorde a corral es una herramienta de intensificación temporal inserta en un planteo pastoril (Pordomingo 2004). Los corrales de engorde constituyen un recurso importante en nuestra región para desestacionalizar el proceso e incrementar la eficiencia en la producción de carne. Estas actividades comprenden el mantenimiento de un gran número de animales en superficies reducidas que están dispuestas generalmente en la inmediatez de un ambiente acuático, muchas veces arroyos o ríos a los cuales el ganado tiene acceso directo y que utiliza como fuente de agua (Fig.1).



Figura 1. Corrales de engorde. Animales con acceso sin restricciones al curso de agua (Arroyo Ingram, sitio de muestreo I4) (Fotografía tomada en Noviembre de 2015, Horak, C.).

El impacto de estas prácticas, especialmente las de engorde en confinamiento, sobre la calidad de agua y la integridad ecológica de los ecosistemas acuáticos ha sido bien documentado en otras regiones del mundo (Dodds y Oakes 2006; Hughes et al. 2016; Scanes 2018). Éste incluye modificaciones físicas derivadas del pisoteo, como el aumento del riesgo de erosión (Malán et al. 2018), cambios en la morfología del canal y en la composición del sustrato, la estabilidad del lecho y la hidrología (Scrimgeour y Kendal 2003) y el aumento de los sedimentos en suspensión (Hughes et al. 2016).

La introducción de excretas (heces y orina) en los arroyos aumenta los niveles de nutrientes como el nitrógeno (nitratos y amonio) y el fósforo (fosfatos) lo que puede conducir a procesos de eutrofización, generando graves problemas en áreas que naturalmente presentan bajas concentraciones de estos compuestos (Scanes 2018). Además, se han detectado también posibles efectos tóxicos producidos por algunas formas de amonio que en algunos casos pueden tener consecuencias sobre la biota (invertebrados acuáticos, peces) (Miserendino et al. 2016). Asimismo, sustancias relacionadas con la salud animal (drogas de uso veterinario) que alcanzan las aguas superficiales a través de los desechos del ganado pueden producir un impacto ecotoxicológico (Mesa et al. 2018). La presencia de patógenos en el agua también está asociada a este tipo de modalidad productiva (Poma et al. 2012). Se han documentado

niveles altos de bacterias fecales aguas abajo de los terrenos de cría, pudiendo alcanzar los cuerpos de agua por deposición directa o por escorrentía (Collins y Rutherford 2004; Vondracek et al. 2005; Xue et al. 2018). El incremento de coliformes fecales y materia orgánica trae como consecuencia el descenso de las concentraciones de oxígeno disuelto (Rizzo et al. 2012).

La presencia de ganado en las zonas de ribera afecta de manera significativa el desarrollo de la vegetación mediante el pisoteo y el forrajeo. Los animales pueden alterar la biomasa de la vegetación ribereña y además modificar la cobertura vegetal de los autótrofos (plantas acuáticas) dentro del arroyo (Muenz et al. 2006), degradando e incluso reduciendo la diversidad de hábitats de los organismos que habitan los ecosistemas acuáticos entre otras, por deposición de sedimentos y remoción del lecho (Declerck et al. 2006).

### 1.3.2. Cultivo de pasturas y forrajes

Como se mencionó anteriormente, el engorde de animales para producción de carne en sistemas pastoriles con suplementación estratégica es una práctica común en esta región. El cultivo de pasturas y forrajes garantizan la disponibilidad de alimento para los animales, reduciendo parcialmente el costo que resulta de la compra y transporte de granos. Un informe reciente indica que los principales cultivos desarrollados en el noroeste de la provincia del Chubut son de alfalfa pura y pasturas mixtas, destinadas tanto a la preparación de reservas como a pastoreo directo. En cuanto a cultivos anuales destinados a forraje, se siembran principalmente cebada y avena (Bobadilla y Lexow 2012).

La implementación de áreas de cultivo muchas veces implica la eliminación de parches de bosques remanentes y de bosques de ribera. Esta modificación afecta directamente las características de los sistemas hídricos ya que aumenta la llegada de sedimentos y nutrientes a los cauces, y genera inestabilidad de las márgenes, por lo que los procesos de erosión se ven favorecidos. Asimismo, la remoción de los bosques de ribera resulta en la eliminación del sombreado sobre el curso de agua, lo que genera un aumento de la temperatura, pudiendo alterar incluso los regímenes térmicos (Quinn et al. 1997; Rutherford et al. 1997) y modificar la producción de autótrofos (Scarsbrock y Halliday 1999; Jones et al. 2001; Rivolzi et al. 2011).

Dado que en muchos casos se aprovecha el agua de los cursos para alimentar sistemas de riego, la implementación de la agricultura también está acompañada muchas veces de la canalización, el dragado y el encauce de los ríos y arroyos o incluso derivaciones para suministro, produciendo en muchos casos la desconexión de algunos pequeños cursos de agua del sistema principal. Todas estas actividades resultan en la disminución en la variedad de ambientes disponibles para la biota lo que puede determinar una reducción en la riqueza y diversidad de especies presentes.

Si bien en la provincia del Chubut cerca del 80% de la producción hortícola se realiza en el Valle Inferior del Río Chubut (VIRCh) (Albertoli et al. 2016), la actividad se está afianzando también en la región cordillerana. En esta zona, se destacan principalmente las producciones de zanahoria, frutillas y arándanos. Las mismas son realizadas a pequeña escala (trabajo familiar), con un uso no regulado de agroquímicos (pesticidas y fertilizantes), escaso uso de tecnologías y de técnicas post-cosecha.

#### **1.4. Influencia del uso de la tierra sobre la integridad ecológica de ríos y arroyos en Patagonia: antecedentes.**

El desarrollo económico de nuestra región está íntimamente relacionado a los ecosistemas de agua dulce, siendo el agua un recurso utilizado para el consumo, el riego, la generación de energía eléctrica, así como con fines recreativos y turísticos. Distintas actividades humanas están modificando el paisaje de la región y han sido abordadas en diferentes estudios (Miserendino 2004; Miserendino et al. 2008, 2010). En este sentido, un trabajo que evaluó la calidad de las riberas de ríos del noroeste del Chubut sometidos a distintos usos de la tierra indicó que las urbanizaciones y el desarrollo de pasturas para sostener la ganadería fueron las actividades que generaron consecuencias más severas sobre el corredor ribereño. Este tipo de transformaciones de los bosques de ribera tienen como consecuencia la pérdida de la cobertura vegetal, la disminución de los aportes de materia orgánica particulada, así como la modificación de las cuencas de drenaje (Kutschker et al. 2009; Masi y Miserendino 2009). Sitios ubicados en territorios convertidos a pasturas para el mantenimiento de ganado en condiciones extensivas mostraron aumentos en la conductividad eléctrica, la temperatura del agua y las concentraciones de sólidos en suspensión, sin embargo no

evidenciaron un enriquecimiento en nutrientes ni modificaron significativamente los valores de clorofila perifítica (Brand y Miserendino 2015).

### **1.5. Biomonitorio**

Dado que existen numerosos cambios en el uso de la tierra que afectan de manera directa a los ríos y arroyos, resulta de gran importancia encontrar metodologías que permitan evaluar el estado de dichos sistemas y monitorear los cambios que allí ocurren a lo largo del espacio y el tiempo (Barbour et al. 1999, 2006). Si bien años atrás era habitual que la calidad de los cursos de agua fuera evaluada utilizando principalmente parámetros físicos, químicos y bacteriológicos, resulta importante destacar que éstos solo reflejan las condiciones del agua en el momento del muestreo, y no integran las numerosas interacciones que ocurren en estos ambientes, y entre éstos y la biota a lo largo del tiempo. La necesidad de ampliar la escala temporal en los abordajes ha llevado a la implementación del uso de organismos que habitan estos ambientes como biomonitores (García et al. 2009; Gómez et al. 2012; Mauad et al. 2015; Brand y Miserendino 2015).

El biomonitorio, en los diferentes niveles de organización biológica, puede aportar alertas tempranas de cambios que puedan resultar en un riesgo para especies individuales (incluidos los seres humanos), poblaciones, comunidades o ecosistemas (Burger 2006). Estos aportan datos cuantitativos que pueden ser obtenidos de distintas fuentes que involucran sistemas bióticos y abióticos, en diferentes escalas espaciales y temporales.

El biomonitorio implica el uso de variables biológicas para evaluar un ambiente determinado mediante diferentes bioindicadores, entre los que se encuentran los biomarcadores (Gerhard 1996). De esta manera, el biomonitorio permite identificar y seguir cambios en el ambiente, proporcionando información sobre su estado actual y sobre eventos ocurridos en el pasado. Puede ser utilizado para detectar cambios en la calidad del agua, en el hábitat dentro del curso de agua, modificaciones que se producen en el resto de la cuenca e incluso la aparición de sustancias tóxicas (Chapman 1996; Reece y Richardson 2000; Fent 2004; Cortelezzi et al. 2013). En este sentido, Los *bioindicadores* han sido utilizados para identificar efectos de la exposición a diferentes disturbios evaluados en niveles altos de organización como por ejemplo, organismos,

población, comunidad, ecosistema. Los *biomarcadores*, por su parte, han sido definidos como “variaciones inducidas por *xenobióticos*<sup>1</sup> evaluadas a nivel subcelular que se manifiestan como respuestas bioquímicas, celulares o fisiológicas en un determinado sistema o muestra biológica” (Peakall 1994). Estos parámetros pueden ser evaluados tanto en poblaciones naturales provenientes de hábitats contaminados, como en organismos expuestos experimentalmente a contaminantes. Estos indicadores señalan la respuesta de los organismos a la exposición de sustancias tóxicas. Las variaciones de un biomarcador contribuyen proporcionando información acerca del estrés al que están sometidos diferentes organismos y sobre sus posibles repercusiones a nivel de la población (Hyne y Maher 2003).

De esta manera, los biomarcadores reflejan características del estado de salud de los organismos en niveles de organización biológica más bajos, que responden relativamente rápido al estrés, presentando una alta relevancia toxicológica (Fig. 2). Sin embargo, las condiciones controladas de laboratorio, en las cuales se realizan los estudios con biomarcadores, raramente reflejan las condiciones naturales, por lo que si bien son muy útiles para determinar los efectos producidos por algunos contaminantes, poseen un realismo ecológico limitado. Los bioindicadores que reflejan las condiciones de salud en niveles de organización más altos, si bien responden más lentamente al estrés y presentan una menor relevancia toxicológica tienen una alta relevancia ecológica, dado que reflejan la respuesta de los organismos a múltiples disturbios presentes y pasados (Adams et al. 1989; Yeom y Adams 2007).

La combinación de ambas estrategias ha demostrado ser útil para abordar el cumplimiento de normas ambientales, siendo utilizados en los procesos de evaluación de riesgos ecotoxicológicos (Power y Adams 1997; Adams y Greeley 2000). Sin embargo, si bien se pueden reconocer muchos bioindicadores en los ecosistemas acuáticos no todos reúnen las condiciones para ser considerados biomonitores. Para ello se requiere que estos puedan proveer información de carácter cuantitativo sobre la calidad del ambiente. Es por ellos que es preciso conocer las características de los distintos bioindicadores así como sus respuestas a diferentes tipos de disturbios.

---

<sup>1</sup>En general, se considera xenobiótico a todo compuesto químico, natural o antrópico, presente en un sistema biológico pero ajeno al mismo. De este modo, un compuesto que es normal en un organismo, puede ser un xenobiótico para otro.

Para el desarrollo del presente trabajo se propone la utilización de biomarcadores (actividad del sistema de detoxificación MXR) y bioindicadores (características de las comunidades bentónicas) para la evaluación de la calidad del ambiente.

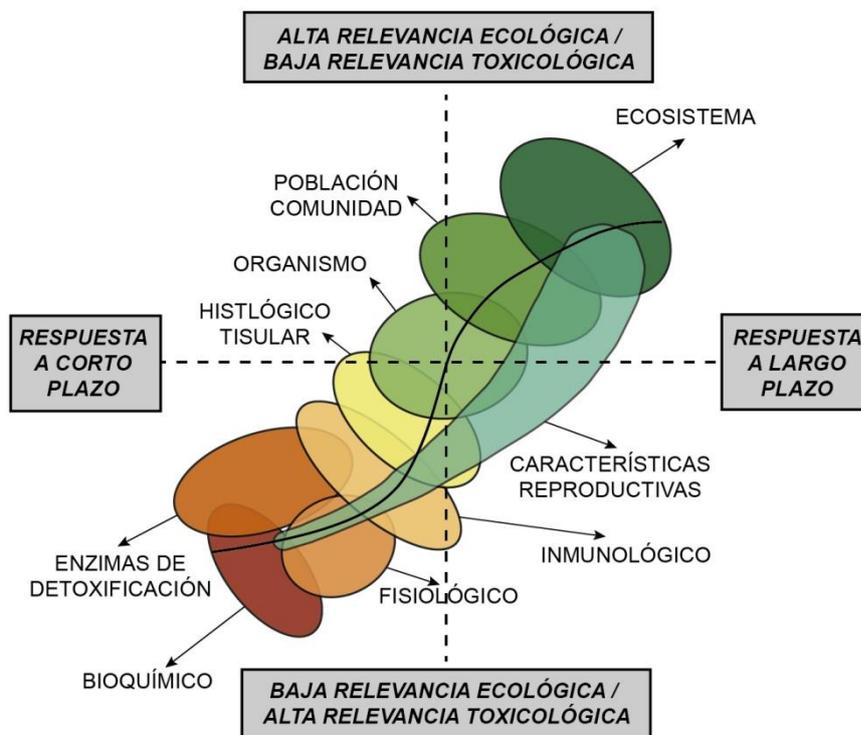


Figura 2. La respuesta biológica a un disturbio varía de manera continua generando un gradiente en relación al tiempo de respuesta y la relevancia toxicológica y ecológica, según el nivel de organización biológica analizado. (Figura basada en el esquema propuesto por Adams et al. 1989).

1.5.1. Mecanismos de detoxificación en organismos acuáticos: sistema de resistencia a múltiples xenobióticos (MXR) como biomarcador de exposición.

Los organismos acuáticos poseen mecanismos o estrategias que permiten su desarrollo aún en ambientes contaminados. La presencia de condiciones adversas, a menudo resulta en la inducción de diferentes sistemas de defensa o detoxificación celular que incluyen sistemas de biotransformación de fase I y II, metalotioneínas, proteínas de estrés o choque térmico (*heat shock proteins* o hsp), entre otros. El sistema de resistencia a múltiples xenobióticos, reconocido por sus siglas en inglés MXR (*multixenobiotic resistance*), constituye uno de estos mecanismos de protección celular contra diferentes sustancias xenobióticas siendo análogo al fenotipo de resistencia a

múltiples drogas (MDR) observado en tumores humanos (Kurelec 1992). Los fenotipos de MDR/MXR se asocian a la sobre-expresión en las membranas celulares de proteínas que pertenecen a la familia ABC (*ATP-binding cassette*) (Fig.3). Si bien la P-glicoproteína (P-gp o ABCB1) es el miembro mejor caracterizado de esta familia, existen cada vez más evidencias basadas en enfoques funcionales y/o moleculares que demuestran la presencia de otros transportadores ABC en el genoma de diferentes especies acuáticas (Luckenbach et al. 2014; Luedeking et al. 2005; Sauerborn et al. 2010). Estudios recientes destacan el papel de las proteínas de multidroga resistencia, reconocidas por sus siglas en inglés, MRPs (ABCC) y las proteínas asociadas a la resistencia en el cáncer de mamas, BCRP (ABCG2), en el proceso general de detoxificación celular y la cooperación con la vía de biotransformación, que proporcionan a los organismos acuáticos fenotipos de resistencia a diferentes compuestos químicos presentes en ambientes contaminados (Ferreira et al., 2014).

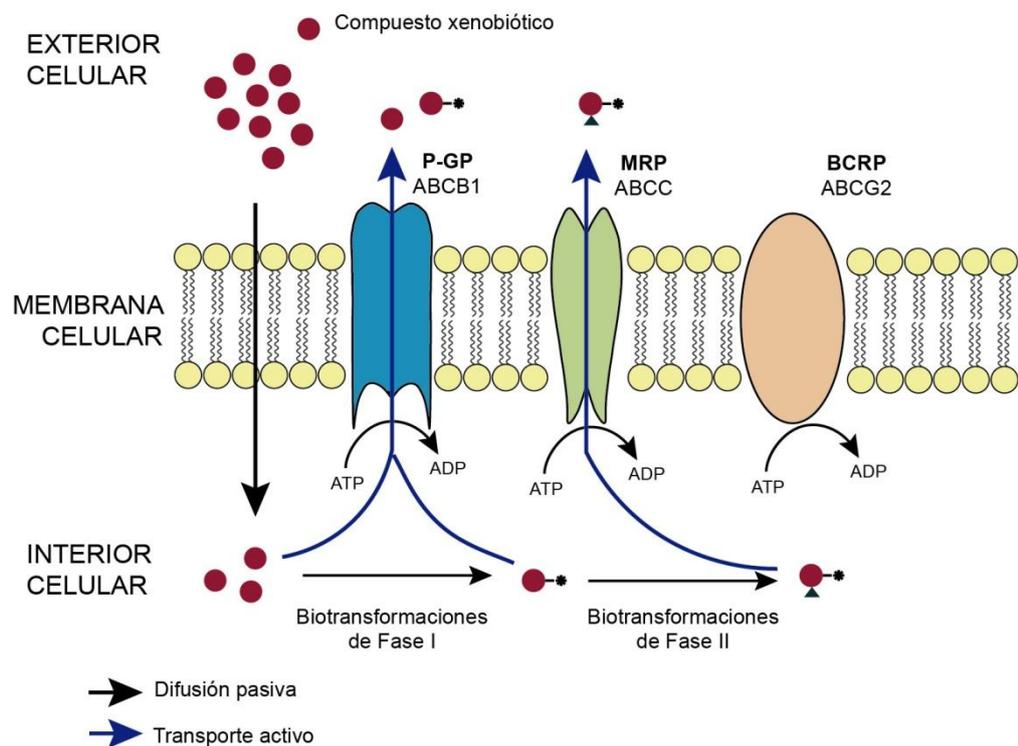


Figura 3. Existen diferentes proteínas de membrana formando parte del sistema de detoxificación MXR, una de estas es la P-gp.

Si bien se han propuesto varios mecanismos para explicar el funcionamiento de P-gp (y proteínas ABC relacionadas), el más aceptado la propone como una bomba dependiente de ATP que reconoce como extraños a una gran variedad de compuestos no relacionados estructuralmente y los transporta fuera de la célula (Fig.4).

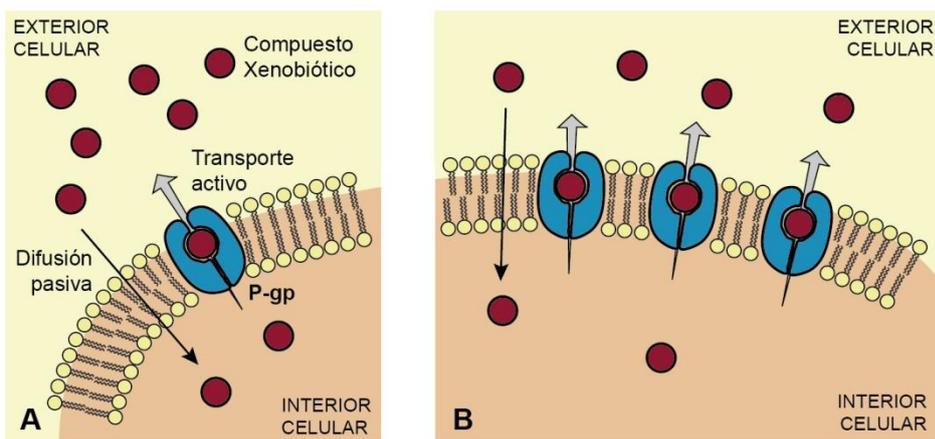


Figura 4. Esquema del mecanismo de Multixenobiótico Resistencia (MXR). Los compuestos xenobióticos llegan al sitio de acción por los vasos sanguíneos, ingresan a la célula por difusión y posteriormente son expulsados de la misma por la P-gp (A). La presencia de xenobióticos en el medio induce la expresión de P-gp, aumentando el proceso de expulsión, impidiendo su acumulación intracelular.

Así, con el desarrollo del fenotipo de MDR, la sobre-expresión de P-gp (u otra proteína ABC) disminuye la acumulación intracelular de drogas quimioterápicas reduciendo su eficacia (Loo y Clarke 2005; Assef et al. 2009). En forma similar, el mecanismo de MXR evita la acumulación intracelular de sustancias perjudiciales para los organismos acuáticos (Kurelec 1992).

Hasta hace un tiempo se creía que el sistema MXR estaba presente en todos los organismos vivos, como una parte constitutiva del sistema de defensa (Kurulec 1992). Sin embargo, existen especies donde la actividad o expresión de P-gp después de haber sido expuestas a inhibidores específicos no ha podido ser demostrada (Damaré et al. 2009; Assef et al. 2014a). Las sustancias que actúan como inhibidores se unen al sitio activo de la P-gp y bloquean la actividad transportadora de la proteína, favoreciendo la acumulación de agentes xenobióticos en el interior celular. Esta característica, junto con la posibilidad de emplear sustratos fluorescentes, permite

identificar la actividad de MXR y utilizarla en ensayos *in vitro* (Yusa y Tsurou 1989; Müller et al. 1996) (Fig. 5).

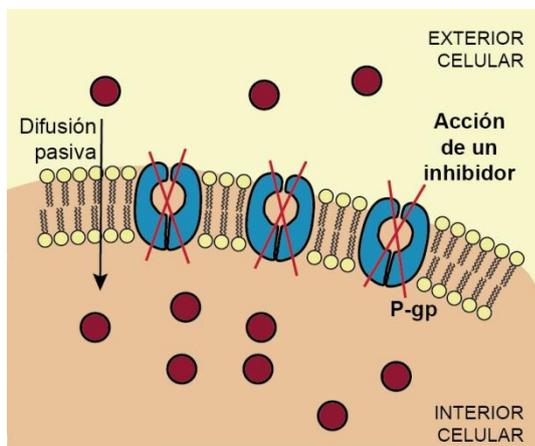


Figura 5. Inhibición del sistema MXR por la presencia de un bloqueante de la P-gp. Cuando la P-gp está inhibida, los xenobióticos se acumulan en el interior celular.

La actividad de MXR y la expresión de P-gp han sido demostradas en varias especies acuáticas incluyendo peces, esponjas de mar, ostras y moluscos (Bard 2000). La baja especificidad de sustrato lo convierte en un mecanismo de primera línea de defensa frente a xenobióticos que protege a las células contra la acumulación de estos compuestos y de metabolitos endógenos tóxicos (Kurelec 1997; Zaja et al. 2008). La exposición crónica de organismos acuáticos a diferentes xenobióticos sustratos de estos transportadores, ya sea en el ambiente natural o en el laboratorio, induce la actividad MXR, por aumento en la expresión de P-gp y/o otras proteínas de transporte, explicando al menos en parte, la resistencia simultánea a diferentes compuestos químicos presentes en aguas contaminadas (Kurelec 1997; Eufemia y Epel 1998; Smital et al. 2000; Zaja et al. 2008). Además, cuando los organismos provenientes de sitios contaminados son llevados a ambientes limpios, se ha observado una desinducción del sistema MXR (Smital *et al.* 2003; Pain y Parant, 2007, Assef et al. 2014b). De este modo, como la actividad de MXR en diferentes especies acuáticas es proporcional al nivel de contaminación del ambiente se lo utiliza como un biomarcador de exposición (Minier y Moore 1996). Este sistema ha sido incluido en planes piloto de monitoreo ambiental (Minier et al. 2006) y en programas de monitoreo a gran escala como el de OSPAR, *Oslo and Paris Convention* (ICES 2010). Sin embargo, no todas las especies

acuáticas expresan el sistema MXR como un indicador sensible de la exposición a contaminantes (Damaré et al. 2009; Hamdoun et al. 2002; Assef et al. 2014a).

1.5.2. Macroinvertebrados bentónicos: bioindicadores de calidad de agua y degradación ambiental.

Los macroinvertebrados bentónicos son invertebrados de talla superior a 1 mm que habitan los sustratos sumergidos de los medios acuáticos. Comprenden principalmente artrópodos (insectos, arácnidos y crustáceos) en sus distintos estadios de vida. Como biomonitores, estos organismos presentan muchas ventajas en comparación con otros grupos de organismos: son ubicuos y diversos, presentan diferentes hábitos alimentarios, son sedentarios y tienen ciclos de vida variados (Barbour et al. 1999, 2006). Los macroinvertebrados bentónicos son utilizados en la evaluación de calidad de agua desde hace décadas por ser buenos indicadores del estado sanitario de los ecosistemas acuáticos (Merritt y Cummins 2007; Allan y Castillo 2007). El uso de bioindicadores a nivel de comunidad, mediante el estudio de ensambles de macroinvertebrados, requiere la transformación de los datos (presencia o abundancia de los diferentes taxa) en alguna expresión sintética de los mismos. A partir de estos métricos primarios se pueden derivar otros como combinación de los primeros dando como resultado los índices multimétricos (Prat et al. 2009). Se han confeccionado distintos índices que combinan riqueza taxonómica y ocasionalmente la abundancia o abundancia relativa de macroinvertebrados, con la tolerancia conocida de cada taxón a un determinado nivel de disturbio o contaminación (Rosenberg y Resh 1993; Chessman 1995; Barbour et al. 1999). Estos índices se basan en el conocimiento taxonómico detallado de la comunidad de macroinvertebrados de cada región, son relativamente fáciles de aplicar y presentan una gran sensibilidad ante las alteraciones del medio (Winterbourn 1981; Sutherland et al. 2012; Tonkin 2014).

En Argentina, se han utilizado ensambles de macroinvertebrados como bioindicadores de calidad de agua en diferentes estudios (Gualdoni y Corigliano 1991; Gualdoni et al. 1994; Domínguez y Fernández 1998; Corigliano 1999; Marchese y Ezcurra de Drago 1999; Miserendino y Pizzolón 1999; Rodríguez-Capítulo et al. 2001; Bauer et al. 2002; Pavé y Marchese 2005; García et al. 2009, Gómez et al. 2012, Cortelezzi et al. 2013; Epele y Miserendino 2015; Macchi et al. 2018). En la región

chilena andina también se han adaptado índices (Figueroa et al. 2003) y recientemente Fierro et al. (2018) han elaborado un índice multimétrico considerando mayormente las realidades regionales de la zona central. Para la zona andino patagónica han sido adaptados dos índices de calidad de agua: el Índice Andino Patagónico (IAP) que considera unidades sistemáticas a nivel género (Miserendino y Pizzolón 1999) y el Monitoreo Biótico de Arroyos Patagónicos (BMPS, por sus siglas en inglés Biotic Monitoring Patagonian Streams index) que se basa principalmente en familias de invertebrados acuáticos (Miserendino y Pizzolón 1999; Miserendino et al. 2008, 2011, 2012).

Varios trabajos en Patagonia también indican que los organismos que forman parte de los ecosistemas fluviales son particularmente vulnerables a cambios en las prácticas de uso del suelo. La riqueza de especies, los índices EPT (Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera) y BMPS reflejan que una buena calidad de agua se correlaciona positivamente con superficies ribereñas cubiertas por bosques y negativamente con aquellas áreas afectadas por urbanizaciones y pasturas evidenciando la respuesta de las comunidades de invertebrados acuáticos a las prácticas de uso del suelo (Miserendino et al. 2011; Brand et al. 2012; Brand y Miserendino 2015; Mauad et al. 2015). También algunos atributos estructurales y funcionales ~~comunitarios~~ han permitido evidenciar el deterioro ambiental relacionado a las modificaciones en el ingreso de la materia orgánica o detrito, los cambios en el sombreado y por ende de la temperatura, la calidad del hábitat, y la salud del ecosistema ribereño. Generalmente las métricas relacionadas a los grupos funcionales alimentarios han evidenciado el impacto del uso de la tierra en cuencas de la cordillera patagónica. Entre otras, se han detectado disminuciones significativas en la riqueza de los desmenuzadores o fragmentadores de hojarasca en relación a sitios de referencia e incrementos de la abundancia de colectores recolectores por aumento del material particulado fino (Miserendino y Masi 2009; Brand y Miserendino 2015).

#### **1.6. Contaminantes de ecosistemas acuáticos asociados a la actividad agropecuaria.**

El desarrollo de las prácticas agropecuarias frecuentemente se asocia a la aplicación de diferentes sustancias a los suelos, como distintos tipos de pesticidas (insecticidas, herbicidas y fungicidas) y fertilizantes, con el fin de mejorar el

rendimiento y aumentar la productividad, como así también la utilización de distintos fármacos en los animales (antibióticos, antiparasitarios, promotores de crecimiento, entre otros). Diferentes estudios alrededor del mundo analizaron las concentraciones de pesticidas aplicados en los campos que alcanzan los cursos de agua próximos por escurrimiento o lixiviación y sus efectos sobre la biodiversidad de organismos acuáticos (Liess et al. 2005; Schäfer et al. 2007; Rasmussen et al. 2012; Potter et al. 2014), o midieron las concentraciones de drogas de uso veterinario que alcanzan dichos ambientes (Boxall et al. 2004; Khan et al. 2008). La problemática de estas nuevas prácticas agropecuarias en Argentina ha sido advertida y se visualiza como uno de los temas emergentes por distintos organismos técnicos y de control (Oesterheld 2008). Sin embargo, son escasos los estudios de esta índole realizados en el país y en particular, ninguno ha sido conducido hasta la fecha en nuestra provincia (Di Marzio et al. 2010; Mugni et al. 2012; Loewy et al. 2011; Macchi et al. 2018; Solís et al. 2018).

### ***Medicamentos de uso veterinario***

Muchos compuestos farmacéuticos son utilizados actualmente para tratar enfermedades, proteger la salud de los animales e incluso como promotores del crecimiento. Antibióticos, antiparasitarios y antifúngicos así como tranquilizantes, drogas antiinflamatorias, entre otras, son aplicadas al ganado con el fin de mejorar su crecimiento a un menor costo y acelerar la llegada de éste al mercado (Boxall et al. 2003). Si bien muchos de estos compuestos son metabolizados por los animales y/o degradados por microorganismos o por la luz solar, los productos de estas transformaciones pueden poseer una toxicidad similar a los compuestos originales (Halling-Sørensen et al. 2002).

El uso veterinario de antibióticos está mundialmente difundido, tanto para tratar y prevenir enfermedades, como para promover el crecimiento de los animales. Estos fármacos son en general muy estables, puesto que de ello depende su mayor efectividad (Bialk-Bielinska et al. 2012) y son mayormente hidrosolubles, pudiendo llegar a los cursos de agua, resultando tóxicos para algas e invertebrados, afectando su desarrollo e inhibiendo su reproducción (De Liguoro et al. 2010; Dalla Bona et al. 2014). Además, el ganado suele recibir también diferentes dosis de drogas antiparasitarias, con el fin de eliminar organismos dañinos como insectos, nematodos y distintos tipos de ácaros que

infectan a los animales y se alimentan de ellos. Si bien estos compuestos no son completamente solubles en agua, tienen la capacidad de permanecer asociados a los sedimentos presentes en ríos y arroyos, afectando a los organismos bentónicos (Sanderson et al. 2007; Mesa et al. 2018).

### ***Sustancias asociadas a la producción de especies forrajeras y pasturas***

La presencia de pesticidas en las aguas superficiales es en parte consecuencia del aumento del uso de productos químicos con el fin de mejorar la productividad agrícola. En las últimas décadas, los volúmenes de agroquímicos utilizados en nuestro país han aumentado drásticamente y con ello, su distribución en el ambiente. Distintos trabajos encuentran residuos de herbicidas e insecticidas en el suelo y en los cursos de agua próximos a los puntos de aplicación (Peruzzo et al. 2008; Mugni et al. 2012; Miglioranza et al. 2013). Algunos autores incluso encuentran insecticidas en el agua, en concentraciones superiores a las recomendadas (Jerentz et al. 2005).

Distintos trabajos de la región sojera de nuestro país abordan los efectos tóxicos de diversos pesticidas sobre organismos “no blanco” como *Hyallorella curvispina*, *Macrobrachium borelli*, *Hydra attenuata*, *Daphnia magna*, *Zilchiopsis collastinensis* y *Cnesterodon decemmaculatus* en ensayos *in vitro* (Jerentz et al. 2004; Mugni et al. 2011, 2013; Demetrio, 2012; Negro et al. 2014; Paracampo et al. 2015). En la región del valle del noroeste del Chubut, herbicidas como glifosato, ácido 2-4 diclorofenoxiacético (2-4 B), ácido 2,4-diclorofenoxibutírico (2-4 DB), metsulfurón metil y aminopyralid, se encuentran entre los más utilizados para combatir el desarrollo de hierbas no deseables en los diferentes cultivos (datos aportados por la oficina de extensión rural del INTA).

Como puede verse, son muchas las sustancias que potencialmente podrían estar ingresando en los suelos en los que se desarrollan estas actividades productivas intensivas y semi-intensivas y que podrían alcanzar las aguas superficiales, e incluso las aguas subterráneas, haciendo necesario conocer el posible efecto de estas actividades en los ecosistemas acuáticos.

### 1.6.1. Contaminantes de ecosistemas acuáticos asociados a la actividad agropecuaria y su relación con el sistema MXR.

Aunque los agroquímicos se encuentran entre los contaminantes ambientales más ubicuos e importantes en todo el mundo, son escasos los trabajos que han estudiado su relación con el sistema de defensa MXR en especies acuáticas. Eufemia y Epel (1998, 2000) reportaron una inducción de la actividad de MXR, medido como eflujo del sustrato fluorescente rodamina B (RB), en el bivalvo *Mytilus californianus* después de períodos de incubación de 72 hs a distintas concentraciones de los pesticidas Chlorthal y Pentachlorophenol. En ambos estudios encuentran un aumento significativo tanto de la acumulación del sustrato fluorescente como de la expresión de la P-glicoproteína asociada a este mecanismo de transporte. De la misma manera, Tutundjian y Minier (2007) documentan una respuesta similar en mejillones *Dreissena polymorpha* expuestos por períodos de 48 h al pesticida Dacthal.

Un trabajo reciente realizado por dos Santos y Martinez (2014) en el bivalvo *Corbicula fluminea* reporta un efecto sinérgico entre los herbicidas Atrazina y Roundup (glifosato), sobre la actividad del sistema MXR, que se ve incrementado por exposiciones de 96 h a estos compuestos. Estos estudios demuestran que la exposición prolongada a concentraciones relativamente pequeñas de algunos pesticidas puede inducir la respuesta del MXR (actividad de MXR y expresión de P-gp), avalando el uso de este sistema como biomarcador de exposición a este tipo de compuestos.

Por otro lado, también existen estudios que señalan que exposiciones agudas (1-2 h) a altas concentraciones de estas mismas sustancias pueden provocar un bloqueo de este mecanismo de transporte, dando lugar a la acumulación intracelular de otros compuestos tóxicos presentes en el ambiente. Esto ha sido demostrado mayormente en modelos celulares humanos que sobre-expresan P-gp (Bain y LeBlanc 1996, Georgantzopoulou et al. 2014, Pivčević y Zaja 2006), y también en organismos no blanco (Galgani et al. 1996; Smital et al. 2004).

### ***MXR en organismos acuáticos de Patagonia***

Si bien el sistema de transporte MXR emerge como un mecanismo general de defensa contra xenobióticos, no representa un indicador sensible de la exposición a

contaminantes en todas las especies acuáticas estudiadas. Hasta el momento la mayor parte de los estudios sobre este mecanismo provienen de Europa y América del Norte y son escasas las especies en las que ya se ha identificado el mecanismo MXR y que se encuentran en ecosistemas acuáticos de nuestra región, haciendo necesaria la caracterización del sistema en especies locales (Epel et al. 2008, Hamdoun et al. 2002, Damaré et al. 2009, Strum et al. 2001, Valton et al. 2013). Algunos trabajos han abordado el mecanismo de MXR en peces de agua dulce de Patagonia. Investigaciones recientes reportaron la participación de proteínas Abcc en la eliminación de microcistina-LR, una toxina producida por cianobacterias, en *Odontesthes hatcheri* (pejerrey patagónico) y *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoiris) (Bieczynski et al. 2014, 2016). Por su parte, se ha visto también que insecticidas como el benzoato de emamectin, presenta un efecto regulatorio sobre la expresión de P-gp y MRP1 (Abcc1) en tejidos de trucha arcoiris.

En trabajos previos describimos la actividad del sistema MXR asociada a la expresión de P-gp en el molusco exótico de agua dulce *Physa acuta* y en especies de hirudíneos patagónicos: *Helobdella michaelsoni*, *Helobdella simplex* y *Patagoniobdella variabilis*, obtenidos de una sección post-urbana del Arroyo Esquel (Assef et al. 2014a y b). Recientemente, también identificamos la actividad de MXR asociada a P-gp en diferentes tejidos de cuatro especies de peces (nativas y exóticas) presentes en la región noroeste de Chubut (Assef et al. 2018). Utilizamos enfoques moleculares y ensayos funcionales que miden la acumulación y/o el eflujo de un sustrato fluorescente de estas proteínas de membrana como la RB en presencia y ausencia del inhibidor modelo de P-gp, verapamilo. En estas especies se observó un incremento de la RB acumulada en presencia del inhibidor en comparación con el grupo control, indicando la actividad del sistema MXR. Sin embargo, este mecanismo de detoxificación no fue detectado otros organismos estudiados como *Chironomus gr. riparius* y *Hyaella curvispina*, al menos con las técnicas utilizadas. En *P. acuta* se observó también, una desinducción del sistema luego del mantenimiento de los organismos en agua limpia por 7 días (depuración en laboratorio), avalando el papel de MXR como mecanismo de defensa en estos moluscos (Assef et al. 2014a). Además, estos resultados evidencian que los macroinvertebrados bentónicos de agua dulce poseen diferentes niveles de actividad MXR especie-específicos que posiblemente influyan en su distribución natural y en su supervivencia en ambientes contaminados.

Estudios de expresión de proteínas utilizando anticuerpos específicos (*Western blot*) realizados sobre extractos proteicos totales de *P. acuta* revelaron la presencia de P-gp. En concordancia con los ensayos funcionales, observamos una disminución de los niveles de expresión luego de la depuración en el laboratorio. Además también identificamos por primera vez la expresión de P-gp asociada a la actividad del sistema MXR en las tres especies de hirudíneos antes mencionadas, sugiriendo su rol en la eliminación de sustancias tóxicas (Assef et al. 2014b).

Trabajos realizados con *P. acuta* muestran que la actividad MXR y la expresión de P-gp no poseen un patrón de variación estacional, que podría observarse dado que nuestra región posee características climáticas marcadamente distintas a lo largo del año. Sin embargo, se observó que tanto la actividad del sistema como la expresión de dicha proteína presentan una relación lineal moderada con la temperatura del agua del día de colecta, independientemente de la estación del año (Horak y Assef 2017). Estos resultados son consistentes con trabajos previos que describen un aumento de la expresión de P-gp por shock térmico, estando a veces acoplado a la actividad de la hsp70 (Chin et al. 1990; Eufemia y Epel 2000; Vilaboa et al. 2000).

1.6.2. Contaminantes de ecosistemas acuáticos asociados a la actividad agropecuaria y su relación con la biodiversidad de macroinvertebrados bentónicos.

A nivel mundial, varios trabajos han evaluado los efectos producidos por la llegada de agroquímicos a los cursos de agua. Ya sea en diseños de campo o en ensayos de laboratorio en micro y meso cosmos, estos trabajos han encontrado que muchos herbicidas afectan la dinámica de crecimiento de la comunidad perifítica, disminuyendo la productividad primaria, y la tasa de degradación de la materia orgánica, afectando a toda la cadena trófica que se desarrolla en el lugar (Villeneuve et al. 2011; Munze et al. 2017; Muturi et al. 2017). Además, la llegada de pesticidas y drogas de uso veterinario a los cuerpos de agua produce un empobrecimiento de la comunidad de macroinvertebrados, disminuyendo la riqueza de especies y la abundancia de las mismas, afectando de manera particular a las especies más sensibles (Sanderson et al. 2007; Rasmussen et al. 2012; Egler et al. 2012; Rzymiski et al. 2013; Svensson et al. 2017).

En nuestro país, existen también observaciones de los efectos que estas sustancias producen sobre las comunidades de macroinvertebrados acuáticos en cursos de agua que atraviesan cultivos intensivos de granos (Jergentz et al. 2004; Marino y Ronco 2005; Santos et al. 2010) o en terrenos inundables en donde crían ganado (Mesa et al. 2018). Los registros existentes del abordaje de esta problemática en Patagonia han sido basados en el estudio de agroquímicos asociados a la producción frutícola (Venturino y Pechen 2005; Albariño et al. 2007; Rosenbaum et al. 2012; Macchi et al. 2018), pero aún no existe ningún trabajo que estudie el efecto de estas sustancias en los ambientes acuáticos de la provincia del Chubut.

### **1.7. Legislación**

Las políticas de gobierno con respecto a medidas de protección de los ríos y arroyos han sido generadas en diferentes regiones del país, pero la implementación de estas regulaciones ha sido dificultosa (García et al. 2015). Si bien en áreas desarrolladas (ej. Provincia de Buenos Aires) las líneas regulatorias se encuentran establecidas, los expertos han notado que las mismas requieren revisiones, ajustes y ampliaciones (García et al. 2016). En la provincia del Chubut, la legislación con respecto al manejo de desechos de los sistemas de producción agrícola ha sido aprobada recientemente (Decreto Provincial N°1540 Pcia. del Chubut 2016), aunque su implementación aún no se ha llevado a cabo. Este decreto establece la disposición de los desechos y el estiércol, el tratamiento de efluentes y el reuso de aguas residuales, entre otras actividades. Sin embargo, la reglamentación no considera entre otras cosas, la implementación de sistemas de aprovisionamiento de aguas fuera de los arroyos y la restricción del acceso del ganado a los cursos de agua (ej. dispositivos eléctricos) (Becerra y Antayhua 2017).

En relación al uso de sustancias químicas en la producción agropecuaria, la provincia del Chubut regula toda operación que implique el manejo de biocidas y agroquímicos mediante la Ley Provincial de Agroquímicos XI N° 16 (ex Ley N° 4073). Sin embargo, ésta se encuentra en las primeras etapas de aplicación. Esta ley ordena a todas las sustancias registradas en tres categorías, en función de los riesgos que presenten para la producción, comercialización, salud o medio ambiente: a) venta libre, b) restringida o c) prohibida. La venta de agroquímicos comprendidos dentro de la segunda categoría, que incluye a todos aquellos cuya utilización entrañe por su

naturaleza, características, prevenciones y recomendaciones de riesgo para la salud humana, flora, fauna y medio ambiente se debe efectuar sólo en los comercios habilitados por la autoridad de aplicación. Es importante destacar que a fines del 2014, el Ministerio de Desarrollo Territorial y Sectores Productivos del Chubut, encabezó un encuentro interinstitucional destinado a promover la aplicación de la Ley Provincial de Agroquímicos. Entre las primeras acciones a ejecutarse, estaba prevista la aplicación de un esquema básico a partir del 2015, el cual consiste en la realización de dos registros provinciales obligatorios: el REPROMA para los manipuladores de agroquímicos y el REPROATE para los asesores técnicos.

La incipiente regulación de las leyes que existen hasta el momento, y el grado de desarrollo que presentan las diferentes actividades agropecuarias en la región hacen que sea de vital importancia generar conocimiento de base sobre el posible impacto de estas prácticas sobre los ambientes acuáticos y la biota que allí se desarrolla para poder diseñar medidas de mitigación y protección para estos agroecosistemas en Patagonia (Herrero y Gil 2008).

## **1.8. Justificación**

Los cambios que el hombre ha producido en los paisajes naturales a lo largo del tiempo han tenido un fuerte impacto sobre los ecosistemas a escala mundial. Particularmente los ecosistemas acuáticos se han visto afectados no solo por el desarrollo de actividades realizadas directamente sobre los cursos y cuerpos de agua, sino también por las modificaciones producidas en el entorno próximo a los mismos.

El impacto de prácticas agropecuarias intensivas/semi-intensivas sobre la calidad del agua de ríos y arroyos es un tema de interés mundial. El mismo incluye cambios en las condiciones fisicoquímicas del agua por el aumento de la materia orgánica, el enriquecimiento de nutrientes y el incremento en las concentraciones de muchos compuestos como metales, fármacos de uso veterinario y pesticidas, entre otros. Puede apreciarse en estos trabajos que el uso y manejo inadecuado de los cursos de agua provocan el deterioro no solo del recurso hídrico sino también de la vegetación y el suelo, con la consecuente pérdida de la diversidad biológica que allí se desarrolla.

En los últimos años, el uso de tierras para engorde de animales a corral o en modelos semi-intensivos de suplementación estratégica acoplados a sistemas pastoriles,

se ha instalado como una estrategia de producción válida y en aumento en el noroeste de Chubut. Sin embargo, no se han conducido estudios hasta el momento que evalúen el impacto ecológico de estas actividades.

Como se explicó anteriormente, los macroinvertebrados bentónicos son buenos indicadores del estado del ambiente acuático. Muchos organismos acuáticos poseen mecanismos que permiten su desarrollo en ambientes contaminados, ya sea con sustancias tóxicas naturales o de origen antrópico. El sistema MXR asociado a la expresión de (P- gp) constituye uno de estos mecanismos, actuando como una primera línea de defensa frente a la acumulación de sustancias tóxicas. Como este sistema puede ser modulado por numerosos compuestos químicos de función y estructura química muy diversa se lo ha propuesto como un biomarcador en el testeo ecotoxicológico.

El abordaje multidisciplinario propuesto, que incluye no solo análisis de calidad de agua sino también una caracterización ambiental integral y la utilización de macroinvertebrados como bioindicadores a distintos niveles de organización biológica, permitirá recopilar información importante con respecto a cómo estas actividades afectaron y afectan a los ecosistemas acuáticos del noroeste de Chubut al mismo tiempo que permitirá delinear pautas de monitoreo, mitigación y manejo sustentable de estos recursos.



# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1. Hipótesis**

1- La degradación de los sistemas acuáticos como producto del desarrollo de las actividades agropecuarias intensivas y semi-intensivas genera una disminución de la calidad del agua y del ambiente lo que se refleja en cambios de los parámetros físico-químicos del agua.

2- Las especies que sobreviven en las zonas más disturbadas y que expresan el sistema de detoxificación MXR, tendrán niveles de actividad más elevados en los sitios afectados en relación a los organismos presentes en sitios de referencia.

3- Los principales compuestos químicos utilizados en actividades agropecuarias de la región: glifosato e ivermectina, inducen un incremento en la manifestación del sistema de MXR de organismos acuáticos en ensayos *in vitro*.

4- Los procesos de degradación de la calidad del agua y modificación del hábitat resultantes de la actividad agropecuaria resultarán en cambios los ensambles de macroinvertebrados bentónicos: incremento de especies tolerantes y disminución de especies sensibles a la contaminación.

### **2.2. Objetivos**

#### **2.2.1. Objetivo General**

Evaluar la influencia de las prácticas agropecuarias semi-intensivas e intensivas sobre cursos de agua de Patagonia utilizando ensambles de macroinvertebrados bentónicos como biomonitores a distintos niveles de organización biológica. Evaluaremos la integridad ecológica de arroyos que atraviesan zonas agropecuarias, los efectos sobre los ensambles de organismos mencionados y también la actividad del sistema de detoxificación MXR como biomarcador, su relación con la distribución de las especies y su posible utilización en el testeo de contaminantes acuáticos asociados.

#### **2.2.2. Objetivos específicos**

Los objetivos específicos incluyen dos abordajes paralelos, uno a realizarse en el campo que contempla el análisis de datos ambientales, el estudio de comunidades de macroinvertebrados bentónicos y la valoración de la integridad ecológica de arroyos, y

otro que se llevará a cabo en el laboratorio. Este último incluirá el análisis del sistema MXR en moluscos provenientes de las zonas bajo estudio y el testeo de diferentes compuestos químicos utilizados en prácticas agropecuarias en Patagonia como posibles inductores de la actividad de MXR.

- Realizar una caracterización ambiental mediante la determinación de parámetros fisicoquímicos, nutrientes y utilizando métricos cuantitativos basados en macroinvertebrados bentónicos.

- Valorar la integridad ecológica de los sitios analizando la calidad del hábitat y del ecosistema de ribera.

- Identificar las especies de macroinvertebrados bentónicos presentes a lo largo de todo el curso de agua (en sitios de referencia y sometidos a explotación agropecuaria), que expresan el sistema MXR, como candidatos para la evaluación de este biomarcador.

- Definir para las especies seleccionadas en el objetivo anterior, los parámetros óptimos (tiempo de incubación, concentración de RB y verapamilo) par la realización de los ensayos funcionales *in vitro*.

- Comparar la actividad del sistema MXR (ensayos funcionales *in vitro*) en organismos provenientes de los distintos sitios de muestreo.

- Evaluar la capacidad inductora de la actividad del sistema MXR en las especies de moluscos seleccionadas, por exposición prolongada *in vitro* a los compuestos químicos más utilizados en la región (glifosato e ivermectina).

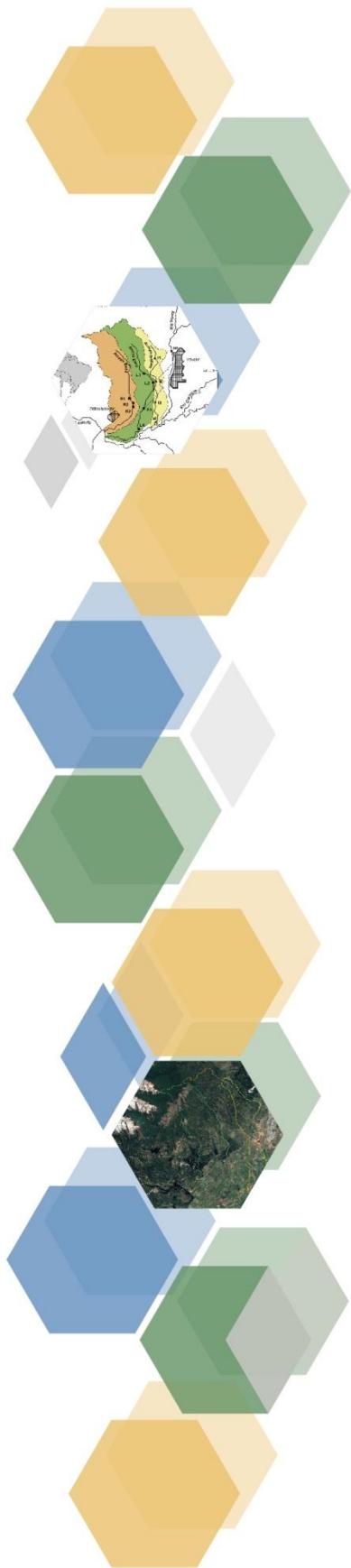
- Identificar asociaciones de especies de macroinvertebrados bentónicos pertenecientes a áreas sometidas a la actividad agrícola-ganadera intensiva y semi-intensiva y comparar con los ensambles de especies de sitios de referencia presentes en arroyos del noroeste del Chubut.

- Realizar un análisis integral de las posibles relaciones entre las variables ambientales y las comunidades de macroinvertebrados en los distintos sitios.

- Evaluar el efecto de las prácticas de mitigación de actividades agropecuarias en la integridad ecológica de arroyos de piedemonte de Noroeste del Chubut.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



# ÁREA DE ESTUDIO

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Área de estudio

La Patagonia argentina se extiende desde el extremo sur del continente, hacia el norte hasta los ríos Colorado y Barrancas. La región se encuentra limitada al este por el océano Atlántico y al oeste por la Cordillera de los Andes. La región representa aproximadamente un tercio de la superficie total de la Argentina continental, desde los 36° de latitud Sur y hasta los 55°S.

El área de estudio se localizó en el noroeste de la provincia del Chubut (Argentina), entre las latitudes 42°40' y 43°10' Sur y las longitudes 71° 30' y 72° 40' Oeste. Se seleccionaron tres arroyos pequeños, de primer orden, tributarios del Río Corintos (Sistema Percy-Futaleufú). Las subcuencas estudiadas, denominadas Ruca, Enna e Ingram, están ubicadas en un área de transición en la zona de piedemonte entre la ciudad de Trevelin y el paraje Aldea Escolar.

Los arroyos están localizados en la ecorregión de los Bosques patagónicos, subregión de bosques septentrionales, en el complejo bosques húmedos septentrionales (Morello et al. 2012). Esta se caracteriza por una alta tasa de precipitaciones, con un gradiente decreciente de Oeste a Este entre los 3000 y los 800 mm.año<sup>-1</sup> y la temperatura media anual del aire se encuentra entre los 6 y los 11°C. La mayoría de los ríos y arroyos de la cordillera se alimentan principalmente de las precipitaciones pluviales y nivales del oeste. El régimen hidrológico de estos sistemas muestra dos picos máximos en el año, el primero debido a las fuertes precipitaciones invernales y el segundo causado por el derretimiento de hielo y nieve en las montañas durante la primavera (Coronato y del Valle 1988).

Los suelos dominantes en el área son Molisoles e Inceptisoles, los cuales poseen buena permeabilidad y drenaje (Panigatti 2010). La vegetación se corresponde con la de los bosques subantárticos caracterizados por la presencia de especies arbóreas perennes, como *Austrocedrus chilensis*, *Nothofagus dombeyi*, y *Maytenus boaria*, y no perennes, *Nothofagus pumilio* y *Nothofagus antártica*, entre otras. El estrato arbustivo y herbáceo está compuesto principalmente de *Chusquea culeou*, *Berberis buxifolia*, *Fuchsia magellanica*, *Aristotelia chilensis*, *Oenothera odorata*, *Fragaria chiloensis* y *Geranium* sp, entre otras.

### **3.2. Selección de los sitios**

El presente estudio tuvo el propósito de analizar los efectos producidos por diferentes prácticas agropecuarias que se desarrollan en tres pequeñas subcuencas. Es por esta razón que el diseño de muestreo no estuvo limitado al estudio de sitios de referencia *vs* sitios disturbados, sino que se agregaron sitios de muestreo adicionales ubicados a lo largo de los cauces. Esto tuvo la finalidad de evaluar cambios en el eje longitudinal de cada cuenca, es decir se evaluaron también los cambios producidos a lo largo de cada arroyo, desde el sitio de referencia, y aguas abajo hasta sitios afectados por prácticas agropecuarias (USDA 2003).

Los sitios de muestreo se localizaron como sigue: tres sitios en el arroyo Ruca (R1, R2 y R3), cuatro en el arroyo Enna (E1, E2, E3 y E4), y cuatro en el arroyo Ingram (I1, I2, I3 y I4) (Fig. 5). Los arroyos seleccionados no presentan tributarios en los segmentos estudiados (i.e. R1-R3, E1-E4 y I1-I4) (Fig. 6). Existe una intervención hidrológica (derivación desde un río de mayor orden) por medio de un canal de concreto (1 m de ancho) que transfiere agua por gravedad, desde el río Percy al Arroyo Ingram, entre los sitios I2 e I3. El canal fue construido con propósitos de irrigación y se encuentra en actividad mayormente durante los meses secos del verano. El manejo del canal no se encuentra supervisado, y cada productor obtiene agua a partir de este canal, de manera autorregulada.

La tabla 1 resume el tipo de uso de la tierra que se desarrolla asociado a cada sitio de estudio, así como las características de los emprendimientos ganaderos (número de animales por ha y tiempo de permanencia de estos asociados al sitio), así como las medidas de mitigación del impacto ganadero sobre los arroyos que pudieron ser observadas. Entre estas se registró la exclusión de los animales de los cursos de agua mediante el uso de alambrados y/o cercas eléctricas, el agregado de grava y bloques (enripiado) en el lecho de los arroyos para evitar el enterramiento de los animales, el emplazamiento de bebederos fuera de los cursos de agua, así como la presencia de vegetación forestal en las riberas.

En todos los casos, los sitios numerados como 1 (R1, E1 e I1) fueron determinados sitios de referencia, ya que presentaban las mejores condiciones del sistema, en ausencia de las prácticas intensivas o semi-intensivas que fueron evaluadas. Dado que la ganadería extensiva es una de las actividades más diseminadas en la región

aún los sitios de referencia presentaron animales aunque en cargas menores a 0.5 animales por hectárea.

En el arroyo Ruca, el sitio R2 está localizado próximo a una pequeña instalación de cría de ganado porcino, que presentó medidas de mitigación (presencia de lagunas de estabilización que impiden la llegada de los efluentes a los cursos de agua), y los animales no tuvieron acceso directo al curso de agua. El sitio R3 presentó un sistema de producción de ganado bovino en donde se desarrolla el engorde a corral de los terneros, alimentados por pasturas (fardos), granos y alimento balanceado. Aquí, la mayor carga ganadera (51-100 animales/ha) se presentó en el período comprendido entre Octubre y Noviembre. El sistema de confinamiento incluía un segmento de arroyo (100 m) donde los animales tenían acceso libre al curso de agua durante todo el año.

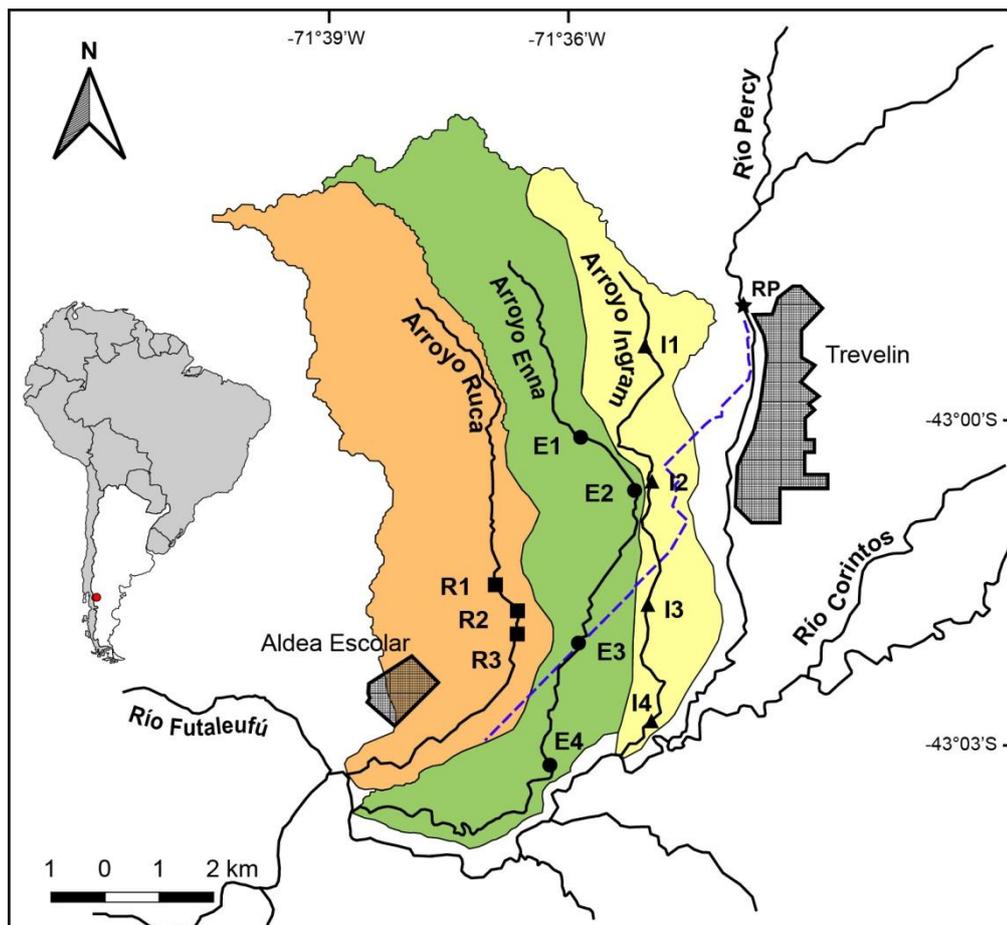


Figura 6. Ubicación de los sitios de muestreo durante el estudio (Noroeste de la Provincia de Chubut, Patagonia, Argentina). Los símbolos indican ■: Sitios en el Arroyo Ruca, ●: sitios en el Arroyo Enna, ▲: sitios en el Arroyo Ingram. La línea punteada indica el canal de concreto que deriva agua desde el Río Percy, hacia los campos.

En el arroyo Enna, el sitio de referencia E1 se ubicó en un área con no detectable o baja carga ganadera (<0,5 animales/ha). E2 y E3 se localizaron en un área de producción ganadera extensiva, y algunas pequeñas producciones hortícolas. El sitio E4 correspondió a un área de bañado/humedal conectado con el arroyo Enna, con una producción ganadera en modalidad semi-intensiva y no confinada. La alimentación de los animales fue en base a pastos naturales y suplementada con forraje.

En el arroyo Ingram, los sitios I2 y I3 estuvieron asociados a la cría de ganado extensivo. El sitio I4 correspondió a un sistema de engorde de animales en confinamiento alimentados con forraje y granos, que concentró la mayor carga ganadera durante julio y noviembre (51-100 animales/ha), mientras que este número disminuyó entre los meses de diciembre y abril (11-50 animales/ha).

A continuación se muestran fichas descriptivas de cada uno de los cursos de agua en las que pueden apreciarse la ubicación de cada sitio de muestreo y fotografías ilustrativas de las actividades que se desarrollan asociadas a cada uno.

Tabla 1. Principales características de los usos de la tierra registrados en los sitios de estudio. Se indican el tipo de uso, así como su intensidad y frecuencia y las medidas de mitigación adoptadas por los propietarios en tres arroyos en el noroeste del Chubut (Patagonia, Argentina). Ribera I: Izquierda, D: Derecha

Sistema	Código de los sitios	Tipo de sistema	Distancia al sitio de referencia (m)	Ribera	Uso de la tierra dominante	Número de ganado vacuno por hectárea	Período de uso ganadero	Medidas de mitigación observadas
Ruca	R1	Arroyo	0	I D	Desarrollo silvopastoril	0,5	Julio-Noviembre	Área forestada Ganader
	R2	Arroyo	680	I	Cría de Ganado porcino en confinamiento (total <80 animales/ha)	-	--	Exclusión del Ganado del arroyo El sistema de confinamiento presenta tratamiento de los efluentes producidos y sistemas de disposición de las heces de los animales.
				D	Cría semi-intensiva de Ganado bovino	1-10	Julio-Octubre	Exclusión del Ganado del arroyo mediante alambrados
	R3	Arroyo	943	I	Ganadería ovina extensiva (< 10 animales/ha)	-	--	Plantación de cortinas de viento (pinos)
				D	Sistema de cría intensiva de Ganado bovino. Confinamiento de los animales con acceso irrestricto al arroyo	51-100 11-50	Julio-Octubre Octubre-Noviembre	Deposición de Grava en el lecho del arroyo (Enripiado)
	Enna	E1	Arroyo	0	I D	Cría extensiva de Ganado bovino	0,5	Julio-Noviembre
E2		Arroyo	1469	I	Producción de forraje	-	--	--

			D	Producción Hortícola	-	--	--
E3	Humedal conectado	5109	I	Cría semi-intensiva de Ganado bovino	1-10	Julio-Octubre	No presenta
			D	Producción de forraje	-	--	--
E4	Humedal Conectado	7862	I	Cría semi-intensiva de Ganado bovino (con acceso de los animales al curso de agua)	1-10	Julio-Octubre	No presenta
			D				
I1	Arroyo	0	I	Mínima intervención antropogénica	-	--	--
			D		-	--	--
I2	Arroyo	3518	I	Producción hortícola	-	--	--
			D	Ganadería ovina extensiva (< 10 animales/ha)	-	--	--
Ingram I3	Arroyo	6058	I	Cría extensiva de Ganado bovino	0.5	Julio-Octubre	Exclusión del Ganado del arroyo mediante alambrados
			D				
I4	Arroyo	8594	I	Sistema de cría intensiva de Ganado bovino. Confinamiento de los animales con acceso irrestricto al arroyo	51-100	Julio-Noviembre	Deposición de Grava en el lecho del arroyo (Enripiado)
			D	Producción de forraje	11-50	Diciembre-Abril	
			D		-	-	--

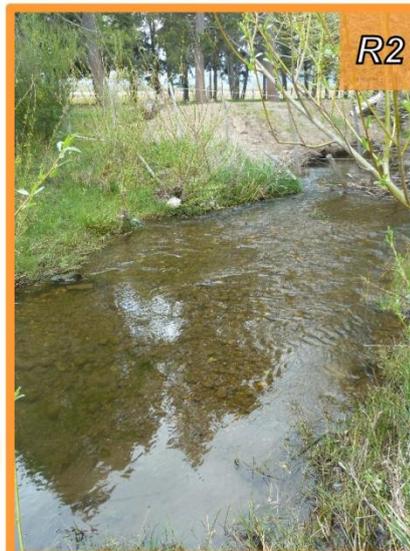
# ARROYO RUCA



**Latitud**  
43° 7' 4,69" S

**Longitud**  
71° 31' 39,67" O

**Uso de la tierra dominante**  
Área forestada con desarrollo silvopastoril



**Latitud**  
43°7' 20,31"S

**Longitud**  
71°31' 21,64" O

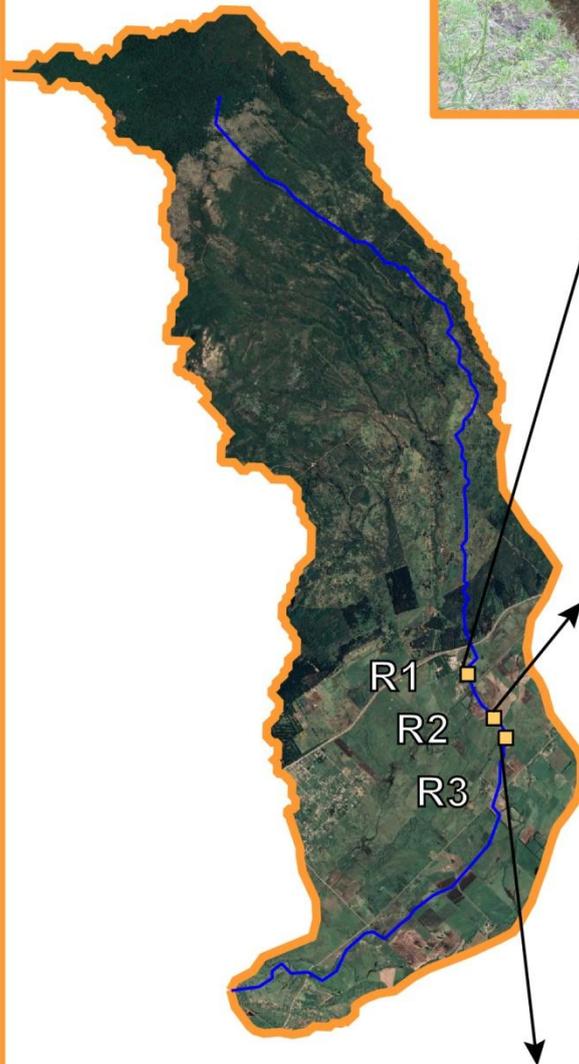
**Uso de la tierra dominante**  
Cría de ganado porcino  
Cría semi-intensiva de ganado Bovino,  
sin acceso de los animales al curso de agua



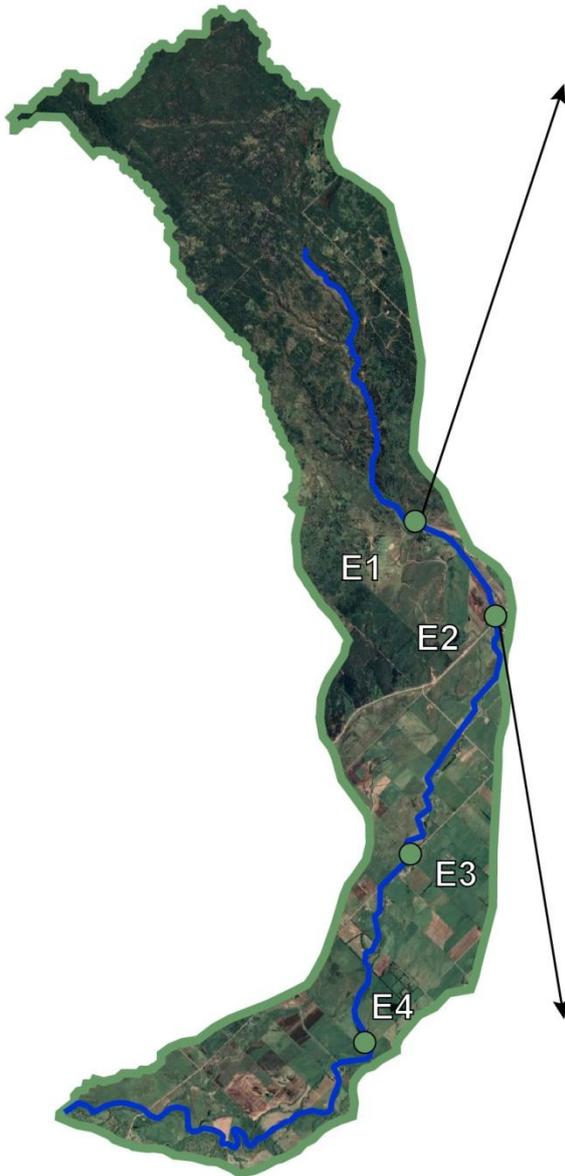
**Latitud**  
43°7'28,38"S

**Longitud**  
71°31'22,72" O

**Uso de la tierra dominante**  
Cría extensiva de ganado ovino  
Cría intensiva de ganado bovino  
animales confinados  
con acceso al curso de agua



# ARROYO ENNA



Latitud 43° 5' 33,90" S

Longitud 71° 30' 27,14" O

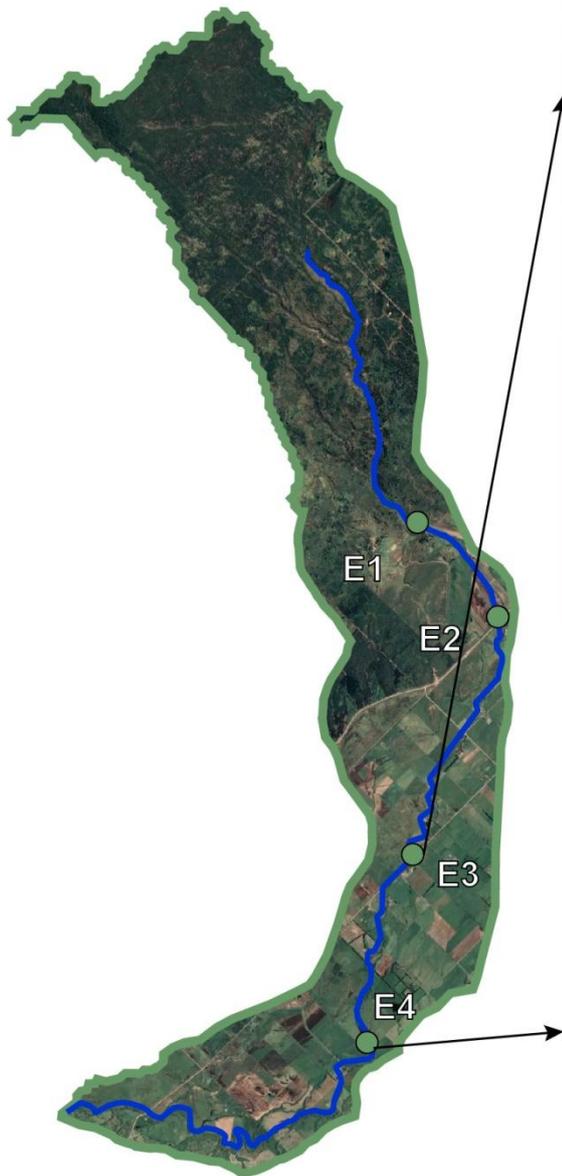
Uso de la tierra dominante  
Área forestada  
Cría extensiva de ganado bovino



Latitud 43°6' 7,96"S

Longitud 71°29' 43,03" O

Uso de la tierra dominante  
Producción forrajera y hortícola



Latitud 43° 7' 41,91" S

Longitud 71° 30' 31,73" O

**Uso de la tierra dominante**  
Cría semi-intensiva de ganado bovino  
con acceso de los animales al curso de agua  
Producción forrajera



Latitud 43° 8' 54,66" S

Longitud 71° 30' 55,05" O

**Uso de la tierra dominante**  
Cría semi-intensiva de ganado bovino  
con acceso de los animales al curso de agua

# ARROYO INGRAM



Latitud 43° 4' 40,15" S

Longitud 71° 29' 37,38" O

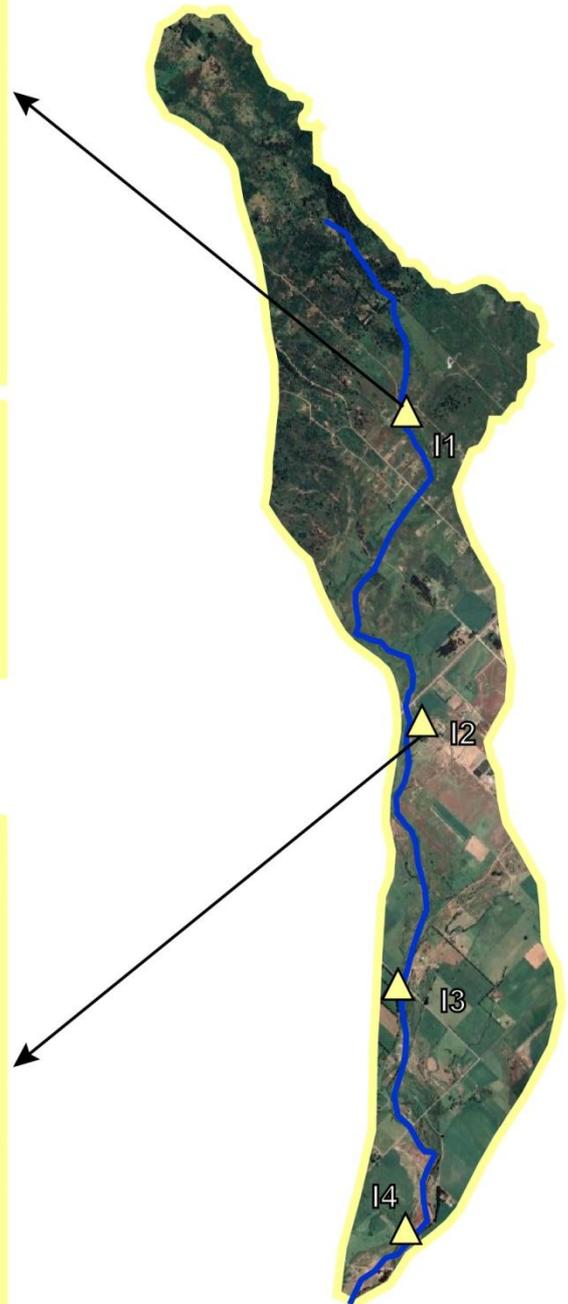
**Uso de la tierra dominante**  
No presenta. Mínima intervención antropogénica



Latitud 43°6' 2,38"S

Longitud 71°29' 34,60" O

**Uso de la tierra dominante**  
Producción hortícola  
Cría extensiva de ganado ovino



## ARROYO INGRAM



Latitud 43° 7' 16,52" S

Longitud 71° 29' 35,06" O

### Uso de la tierra dominante

Cría extensiva de ganado bovino  
sin acceso de los animales al curso de agua

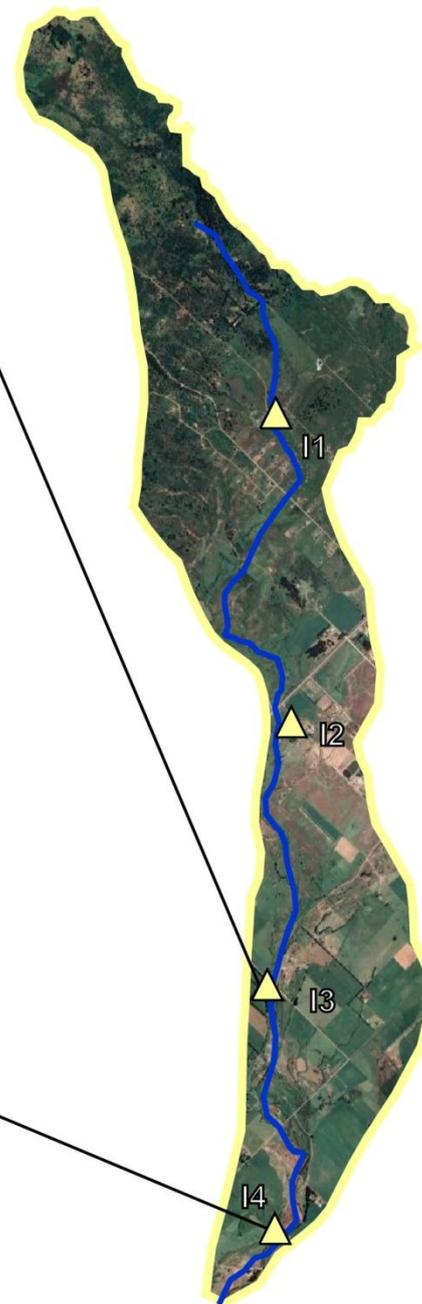


Latitud 43°8' 23,77"S

Longitud 71°29' 33,87" O

### Uso de la tierra dominante

Cría intensiva de ganado bovino  
animales confinados con acceso al curso de agua



### **3.3. Caracterización Ambiental**

El estudio se realizó entre Julio de 2015 y Abril de 2016. Los sitios de muestreo fueron visitados bimensualmente: Julio, Agosto (Invierno), Octubre, Noviembre/Diciembre (Primavera), Febrero (Verano) y Abril (Otoño), para registrar las características fisicoquímicas. Los registros diarios de temperatura media del aire y de precipitaciones fueron obtenidos del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (campo Anexo Trevelin, INTA), el cual tiene una estación meteorológica automática instalada en cercanías del área de muestreo (43°7'37.95"S, 71°33'44.36"O). Dado que el mantenimiento de los animales en esta área ocurre principalmente entre Julio y Noviembre, el diseño procuró examinar las condiciones previas, durante, y después del paso del ganado por los terrenos, además de abarcar también los cambios en los períodos hidrológicos, producto de las lluvias y el deshielo, de los cuales estos sistemas son altamente dependientes. Los muestreos se desarrollaron lejos de eventos de tormentas o lluvias intensas, para evitar los efectos que podrían ser maximizados debido a la escorrentía superficial. Además, la secuencia temporal elegida tuvo el objetivo de que los dos muestreos de macroinvertebrados fueran concurrentes con dos períodos hidrológicos contrastantes, aguas bajas y aguas altas.

La composición del sustrato de los arroyos se estimó en cada sitio utilizando un cuadrado de 1m<sup>2</sup>, registrando los porcentajes de bloques, guijones, guijarros, gravas, arena y limo/arcilla. En todos los sitios se determinaron las principales características físicas y químicas del agua. Se midió la velocidad de la corriente como la media de tres tiradas de un flotador a lo largo de una distancia de 10 m (Gordon et al. 1994). En cada ocasión, se realizó un perfil de profundidad con una varilla graduada, se midió el ancho del lecho seco y mojado a lo largo del tramo estudiado. Dado que no existen estaciones de aforo en ninguno de los sistemas estudiados, el caudal de los arroyos se calculó utilizando la profundidad media, el ancho del lecho mojado y la velocidad de la corriente (Gordon et al. 1994).

En cada muestreo se registró la temperatura del agua (°C), la conductividad eléctrica ( $\mu\text{S}_{20} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), el total de sólidos disueltos ( $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ), el pH, el oxígeno disuelto ( $\text{mg O}_2 \cdot \text{l}^{-1}$ ) y la saturación de oxígeno (% O<sub>2</sub>) (Hach). Se colectaron muestras de agua (2 l), debajo de la superficie, y se las mantuvo a 4 °C hasta la realización de las determinaciones de nutrientes en el laboratorio. Los nutrientes medidos incluyeron

amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrito más nitratos ( $\text{NO}_3+\text{NO}_2$ ) y fósforo reactivo soluble (SRP). Todas las determinaciones fueron realizadas utilizando un espectrofotómetro (DR600) y basados en métodos aprobados por la USEPA y descritos en la Guía de Análisis de Agua de Hach (Hach Co. 2007). El total de sólidos en suspensión (TSS) ( $\pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ ) fue estimado filtrando un volumen conocido de agua con un filtro de fibra de vidrio (GF/F tamaño de poro  $0,7 \mu\text{m}$ ) previamente pesado, secado a  $110 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 4 h y vuelto a pesar (AWWA 1998).

Para los estudios microbiológicos, realizados en agosto y noviembre, se recolectaron muestras de agua en condiciones estériles y se colocaron en frascos de vidrio con tapa a rosca, teniendo en cuenta los métodos estándar para el manejo de este tipo de muestras. Los exámenes bacteriológicos de las muestras de agua incluyeron la identificación del número de unidades formadoras de colonias (UFC) de presumibles coliformes totales, coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* (UFC/100ml). El medio de cultivo utilizado para detectar coliformes totales fue el caldo Lauril Triptosa en la fase presuntiva y el caldo Lactosado Bilis Verde Brillante (LBVB) en la fase confirmatoria, siguiendo los métodos de la American Water Works Association (AWWA 1998).

Los ensambles de macrófitas se evaluaron utilizando un cuadrado de  $1\text{m}^2$ , se obtuvo la riqueza de especies y la cobertura porcentual de todas las especies. Se incluyeron todos los grupos funcionales presentes en cada sitio: emergente (plantas enraizadas, morfológicamente adaptadas para crecer en un sustrato anegado o sumergido), hojas flotantes (plantas enraizadas en el suelo con hojas flotantes) y sumergido (plantas con tejido fotosintético completamente suemrgido) (Cronk y Fennessy 2001). Se registraron también la riqueza de especies de la vegetación presente en la ribera y en la matriz en la que se hayaba inserta el sitio. Se herborizaron las principales especies presentes para su posterior determinación en laboratorio usando claves regionales (Correa 1978; 1999).

Se realizaron análisis de pigmentos fotosintéticos para estimar la biomasa de perifiton presente. Estas medidas se realizaron en agosto y noviembre (2015) y Abril (2016). En cada sitio se colectaron tres muestras de epilíton en zonas de rápidos. Cada muestra consistió en el raspado del material de un área circunscripta por un cilindro de 5 cm de diámetro de la cara expuesta de tres rocas seleccionadas al azar. El contenido fue

preservado y transportado en frío en frascos color caramelo, al laboratorio donde fueron filtrados en filtros de fibra de vidrio (GF/F tamaño de poro 0,7  $\mu\text{m}$ ). Todas las muestras fueron almacenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta que se realizaron los análisis. Se extrajo la clorofila *a* de los filtros utilizando acetona al 90% y midiendo espectrofotométricamente con corrección por feopigmentos de acuerdo a los métodos estándar (AWA 1998; Wetzel y Likens 1991).

### **3.4. Índice de Calidad de Hábitat e integridad del ecosistema de ribera**

Para la evaluación de los posibles disturbios producidos por el ganado tanto dentro de los cursos de agua como en los corredores ribereños, se utilizaron dos índices para ríos de montaña patagónicos y se calcularon para cada sitio de muestreo durante el mes de Octubre 2015. El ICH (Índice de Calidad de Hábitat) fue aplicado para evaluar la calidad del hábitat usando el procedimiento para evaluar arroyos de alto gradiente de Barbour et al. (1999). Este método categoriza 10 características del curso de agua (ej. disponibilidad de sustrato epifaunal, presencia de depósitos de sedimentos, frecuencia de rápidos, estabilidad del lecho, etc.) de 0 a 20. Un resultado total de 200 puntos indica que el arroyo se encuentra prístino en su estado natural y en la mejor condición posible (rango: 150-200). Este índice evalúa la habilidad del ambiente físico del río para albergar flora y fauna, por lo que es también una medida de la heterogeneidad espacial que presenta el arroyo (Castela et al. 2008).

La complejidad y los atributos de la vegetación ribereña en un segmento de 100 m de arroyo fue evaluado aplicando una adaptación del índice QBR (Riparian corridor quality index, Munné et al. 1998) para arroyos patagónicos: QBRp realizado por Kutschker y colaboradores (2009). Este índice combina información de cuatro métricos aditivos: la cobertura total (proporción del área de ribera que se encuentra cubierta por árboles o arbustos), estructura (proporción de vegetación de la ribera compuesta por árboles o arbustos separadamente), complejidad y naturalidad de la vegetación (número de especies de árboles y arbustos, ausencia de especies introducidas y otros impactos antrópicos en la vegetación), y grado de naturalidad del canal (ej. modificaciones del sustrato, dragado, etc). Este índice también tiene en cuenta diferencias en la geomorfología del arroyo desde la cabecera hasta la zona baja del curso de agua. El

puntaje total de QBRp va desde 0, cuando la degradación del sitio es extrema, a 100 puntos, cuando la calidad del ambiente es excelente y el bosque ribereño nativo se encuentra en óptimas condiciones.

La mayoría de los desarrollos intensivos y semi-intensivos que ocupan las riberas de los arroyos seleccionados para este estudio no implementan acciones para disminuir los posibles efectos producidos por el ganado. Sin embargo, algunas prácticas de mitigación fueron detectadas en los sitios de muestreo. Se documentaron si las márgenes del arroyo fueron enripiadas (depósito de gravas y guijones para compactar el suelo), exclusión del ganado con alambrados o boyeros eléctricos, existencia de bebederos en los desarrollos entre otras. Todas estas acciones fueron itemizadas y descritas, al igual que los restantes usos de la tierra registrados.

### **3.5. Toma de muestras de macroinvertebrados**

Los muestreos de organismos para evaluar la actividad del sistema MXR se realizaron de forma manual. Donde estuvieron presentes, se colectaron moluscos de la especie *Physa acuta* (exótico) y *Chilina dombeiana* (nativo). Individuos de la especie *P. acuta* fueron colectados en los sitios E3, E4, I3 y I4, mientras que organismos de la especie *C. dombeiana* fueron encontrados en los sitios E1, E2, E3, I3, y I4. Los individuos de la especie *P. acuta* presentaron tallas entre 0,5 y 1 cm, mientras que las tallas de los individuos de *C. dombeiana* estuvieron comprendidas entre 0,7 y 1,2 cm. Adicionalmente, se colectaron moluscos en tramos pre-urbanos del Arroyo Esquel con fines comparativos. Una vez colectados, los organismos fueron colocados en recipientes con agua del sitio de colecta y llevados al laboratorio. Los ensayos de caracterización de MXR se realizaron dentro de las primeras 24 h de efectuada la colecta, de manera de evitar posibles desinducciones de este sistema mediado por proteínas durante su mantenimiento (Smital et al. 2003; Pain y Parant 2007).

Los ensayos para evaluar la capacidad moduladora del sistema MXR *in vitro* de diferentes compuestos utilizados en las prácticas agropecuarias (glifosato comercial y principio activo, e ivermectina comercial) fueron realizados sobre moluscos de las especies *P. acuta* y *C. dombeiana*. Dada su abundancia, los primeros fueron colectados en un segmento post-urbano del Arroyo Esquel, mientras que los segundos fueron muestreados en un tramo pre-urbano del mismo arroyo. En este caso, como se busca

determinar si las sustancias antes mencionadas desencadenan un proceso de inducción del sistema, fue necesario realizar previamente una depuración de los organismos en laboratorio como se explicará más adelante.

Los muestreos cuantitativos de macroinvertebrados bentónicos se realizaron en dos momentos contrastantes con respecto a las condiciones hidrológicas: aguas altas (Agosto 2015) y aguas bajas (Octubre-Noviembre 2015). No se tomaron muestras del bentos en los sitios E3 y E4 debido a que las características del sustrato y las condiciones hidrológicas correspondieron más a un humedal (mallín) y no fueron comparables con el resto de los sitios. Se colectaron seis muestras de macroinvertebrados en correderas (n=3) y pozones (n=3) a lo largo de segmentos de arroyo de entre 50 y 100 m. Las muestras se tomaron en cada sitio con una red Surber, con un área de muestreo de 0,09 m<sup>2</sup> y un tamaño de poro de malla de 250 µm. Este protocolo fue definido en base a estudios previos realizados en el área, que incluyeron arroyos de igual orden y similares características del sustrato (Miserendino y Pizzolón 2001; Miserendino 2007). El material colectado fue fijado *in situ* con formol 4%, rotulado y trasladado al laboratorio para su identificación. Una vez allí, los organismos fueron separados, conservados en alcohol 70% e identificados hasta el nivel taxonómico más bajo posible (género o especie) utilizando las claves disponibles para la zona (Domínguez y Fernández 2009; Hamada et al. 2018).

### **3.6. Actividad MXR**

La actividad del sistema MXR de los organismos fue evaluada en el laboratorio con diferentes propósitos: a) para la caracterización general del sistema en el caso de la especie *Chilina dombeiana*, b) para la determinación de su nivel de actividad en función de la intensidad del disturbio o, c) para los estudios de exposición *in vitro* a diferentes compuestos de interés. En todos los casos se utilizó el ensayo de bioacumulación del sustrato fluorescente Rodamina B (RB) que simula el comportamiento de un agente xenobiótico (Smital y Kurelec 1998; Smital et al. 2003; Assef et al. 2014 a y b).

### 3.6.1. Ensayo de bioacumulación de Rodamina B (RB)

El principio de este ensayo se basa en la determinación del nivel de RB acumulada en el organismo luego de un tiempo de exposición a este sustrato fluorescente, en ausencia o presencia de un inhibidor competitivo específico de las proteínas transportadoras de este sistema como el verapamilo. Si un organismo expresa este sistema de detoxificación, es esperable que una inhibición del mismo se acompañe de un incremento en los niveles de acumulación de RB en su interior.

En todos los casos, los moluscos colectados se dividieron en dos grupos y se colocaron en recipientes (cinco ejemplares en cada uno) con 50 ml de agua sin cloro, suplementada con 5  $\mu$ M de RB (Sigma, St. Louis, MO, USA) por 4 h, protegidos de la luz. Éste es el tiempo suficiente para que el sustrato atraviese las membranas celulares por difusión pasiva y se acumule en el interior de los organismos (Assef et al. 2014a; Parant y Pain 2001). Esta incubación se realizó en ausencia (control) y en presencia de verapamilo 30  $\mu$ M (Sigma). Después del período de exposición, los moluscos fueron lavados y se aislaron los cuerpos del caparazón cuidadosamente. Luego fueron pesados y posteriormente transferidos a tubos tipo eppendorf con 0,5 ml de agua destilada donde se homogeneizaron durante 30 s con un homogeneizador mecánico Pro200 (Pro Scientific Inc. USA). Los homogenatos fueron centrifugados (3000 x g, 5 min) y los sobrenadantes conteniendo la RB en solución fueron transferidos a tubos limpios para la determinación inmediata de la fluorescencia (QuantiFluor-TM, Promega) (Fig. 7).

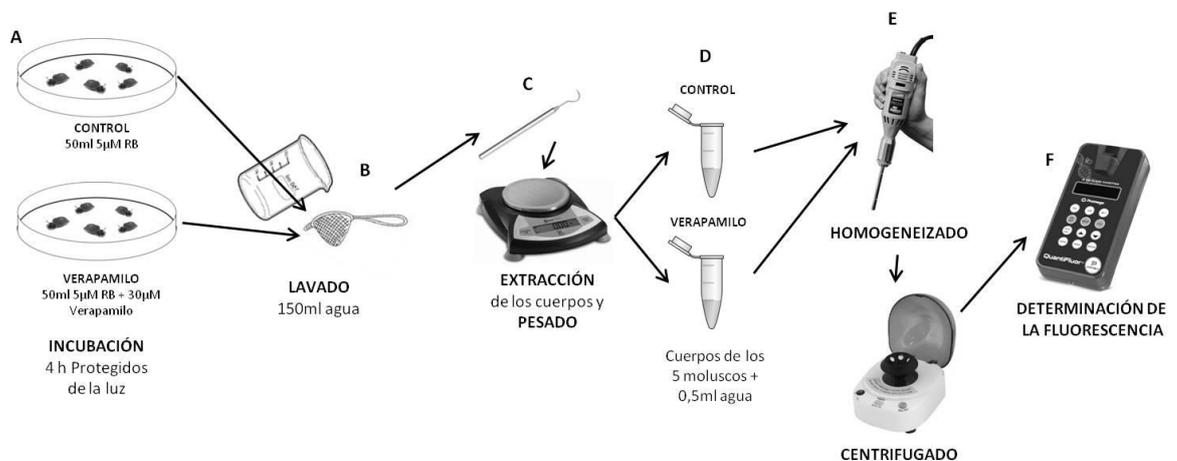


Figura 7. Determinación de la actividad MXR mediante el ensayo de bioacumulación de RB. Esquema del proceso llevado a cabo en el laboratorio: incubación de las muestras con la

solución de RB en presencia o ausencia del inhibidor (A), lavado de los especímenes (B), extracción de los cuerpos y pesado (C), colocación en tubos eppendorf (D), homogenización mecánica y centrifugado (E) y determinación de la fluorescencia (F).

El protocolo antes descrito, fue definido para moluscos de la especie *P. acuta* (Assef et al. 2014a), por lo que para su implementación en la especie nativa *C. dombeiana* debieron verificarse los tiempos de incubación y las concentraciones de sustrato fluorescente y de inhibidor, de manera de evitar posibles saturaciones de este sistema de transporte (Galgani et al. 1996). En forma similar se estableció la menor concentración de inhibidor a utilizar capaz de lograr la mayor inhibición posible de la actividad de MXR.

El criterio principal para la cuantificación del nivel de actividad MXR fue la relación R cuyo valor se calculó dividiendo la cantidad de RB acumulada en ausencia de inhibidor (control) con la cantidad de RB acumulada en presencia del mismo. Por lo tanto, el máximo valor de R ( $R= 1$ ) se obtiene en ausencia de actividad MXR, mientras que el mínimo valor de R tiende a 0 y se corresponde con la máxima actividad del sistema (Smital et al. 2000) (Fig. 8). Los valores de acumulación basales (en ausencia de inhibidor) también brindan información acerca de la actividad del sistema.

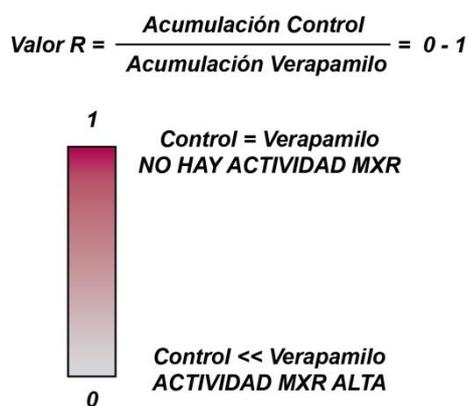


Figura 8. Determinación de la actividad MXR, cálculo e interpretación del Valor R.

### 3.6.2. Depuración

Antes de realizar los bioensayos de exposición *in vitro* a distintos compuestos potencialmente tóxicos, fue necesario evaluar la actividad de MXR de los organismos seleccionados, *P. acuta* y *C. dombeiana*, luego de la desinducción del sistema en el laboratorio, denominado depuración. Esto es necesario ya que el sistema podría encontrarse inducido por la presencia de sustancias naturales o de origen antrópico capaces de modularlo (Eufemia et al. 2002). Para ello, los organismos fueron mantenidos por 7-10 días en agua limpia libre de cloro, aireación continua y alimentación *ad libitum*. El tiempo de depuración fue establecido en base a estudios *in vitro* de la biosíntesis, procesamiento y vida media de P-gp (Zhang y Ling 2000) así como de resultados acerca del mecanismo MXR en otros organismos acuáticos. Se asume que el nivel de MXR en estas condiciones se corresponde con el nivel basal del sistema (Pain y Parant 2007; Assef et al. 2014a).

### 3.6.3. Ensayos de exposición a compuestos tóxicos *in vitro*.

Estos estudios evaluaron la actividad del sistema MXR mediante el ensayo de bioacumulación de RB antes mencionado, luego de la exposición *in vitro* de los organismos a diferentes compuestos potencialmente tóxicos utilizados en las actividades agropecuarias que se realizan en la región. Se utilizaron sustancias como el glifosato comercial (Gleba), el principio activo del glifosato (Sigma) y la ivermectina comercial (Bagomectina 1%). Estos compuestos son dos de los más utilizados en la región, según la información proporcionada por miembros del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA – Estación Experimental Agropecuaria Esquel). Los ensayos evaluaron la existencia de un efecto inductor sobre el MXR por exposición a diferentes tiempos y concentraciones de los principios activos de estos agroquímicos (Tabla 2). Las concentraciones establecidas contemplaron valores reportados en el ambiente en otras regiones del país, obtenidos de bibliografía. En el noroeste del Chubut no hay estudios realizados al respecto.

Tabla 2. Concentraciones de los compuestos químicos utilizados para su capacidad inductora del sistema MXR

Compuesto	Concentraciones utilizadas ( $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ )						
	0	0,01	0,1	1	10	100	500
Glifosato comercial (Gleba)	x		x	x	x	x	x
Glifosato (principio activo – Sigma)	x		x	x	x	x	x
Ivermectina comercial (Bagomectina)	x	x	x	x	x		

Los organismos ya depurados fueron expuestos durante períodos de 96 h y 240 h, tiempo suficiente como para evidenciar una respuesta en la expresión de esta familia de proteínas, si es que estas fueron efectivamente moduladas por estas sustancias. Transcurrido este lapso, se realizaron los ensayos de bioacumulación de RB ( $\pm$  verapamilo) en organismos mantenidos en agua limpia ( $0 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  = Control) y los expuestos a las diferentes concentraciones de las sustancias mencionadas. Dado que todos los compuestos testeados son solubles en agua, no fue necesario realizar estos experimentos en presencia de otros solventes.

### **3.7. Evaluación de atributos comunitarios de los ensamblajes de macroinvertebrados bentónicos y cálculo de métricas**

Para cada sitio y fecha se confeccionaron listas de especies. Se calculó la densidad total de individuos por cada muestra ( $\text{ind} \cdot \text{m}^{-2}$ ) y la densidad media total para cada sitio (media de 6 réplicas). Se estimó la riqueza y la abundancia relativa para especie representada por sitio. Se obtuvieron datos de abundancia absoluta y abundancia relativa de grupos funcionales. Previamente se realizó una categorización funcional utilizando bibliografía pertinente (Merritt et al. 2008; Miserendino et al. 2011, Miserendino y Masi 2010). Se calcularon 34 descriptores de la comunidad de macroinvertebrados para cada sitio y momento de muestreo. Algunos métricos fueron determinados a partir del total de muestras de cada sitio por momento del año (ej. medidas de riqueza), mientras que otros fueron calculados como promedios a partir de las muestras individuales (Barbour et al. 1999). Los métricos empleados estuvieron basados en riqueza y abundancia (15 métricos), tolerancia (4 métricos), composición (3 métricos) y atributos funcionales (10 métricos), y se incluyeron índices utilizados comúnmente para evaluar la calidad de los ríos y arroyos Patagónicos, como el Biotic Monitoring Patagonian Streams (BMPS), y

el Índice Andino Patagónico (IAP) (Miserendino y Pizzolón 1999; Miserendino 2007; Miserendino et al. 2011). El BMPS se calculó sumando los puntajes correspondientes a todas las familias de invertebrados presentes en la muestra. Estos puntajes (1-10) de cada familia dependen del grado de sensibilidad a la contaminación que estas presentan. El rango potencial de este índice va desde 0, cuando el sitio se encuentra muy perturbado (aguas muy contaminadas) a valores >150, cuando el sitio se encuentra menos perturbado (excelente calidad del agua). El IAP es un índice que trabaja a nivel de género/familia y calcula las respuestas de los distintos taxa al enriquecimiento orgánico. El rango potencial del IAP va desde 1, en los sitios más perturbados, a 10, en los sitios en los cuales las condiciones son mejores (Tabla 3).

Se examinó el rango, el promedio, la desviación estándar y la respuesta predicha al disturbio de todos los métricos obtenidos. Los métricos que mostraron muchos ceros en las matrices fueron descartados (ej. cuando los métricos evaluados estaban basados en especies o rasgos que no eran comunes en los sitios evaluados). También se descartaron métricos con poco rango de variación entre sitios. Aquellos métricos que segregaron claramente los sitios (referencia vs disturbados), o que mostraron una respuesta significativa al gradiente de disturbio, fueron elegidos para para incluirlos en el desarrollo de modelos lineales generalizados.

**Tabla 3.** Clasificación y respuesta predicha al disturbio de los métricos comunitarios utilizados en el presente estudio.

Métrica	Respuesta predicha
<i>Riqueza y abundancia</i>	
Riqueza total	Disminuye
Riqueza de Plecoptera	Disminuye
Riqueza de Ephemeroptera	Disminuye
Riqueza de Trichoptera	Disminuye
Riqueza de Coleoptera	-
Riqueza de Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera (EPT)	Disminuye
Riqueza de Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera, Coleoptera (EPTC)	Disminuye
N° familias de insectos	Disminuye
Riqueza de Chironomidae	Disminuye
Riqueza de Orthocladinae	Disminuye
EPT/Riqueza de Chironomidae	Disminuye

---

Densidad Total	Aumenta
Densidad de Plecoptera	Disminuye
Densidad de Ephemeroptera	Disminuye
Densidad de Trichoptera	Disminuye
<i>Tolerancia</i>	
Diversidad de Shannon	Disminuye
Densidad de Annelida	Aumenta
Densidad de Oligochaeta	Aumenta
% taxa tolerantes	Aumenta
<i>Composición</i>	
% EPT	Disminuye
% Chironomidae	Aumenta
EPT/Chironomidae %	-
<i>Grupos funcionales alimenticios</i>	
Riqueza de fragmentadores	Disminuye
Riqueza de raspadores	Aumenta
Riqueza de Predadores	Variable
Riqueza de Colectores-Filtradores	-
Riqueza de Colectores-Recolectores	Aumenta
% Desmenuzadores	Disminuye
% raspadores	Variable
% Predadores	Variable
% Colectores-Filtradores	Variable
% Colectores-Recolectores	Aumenta
<i>Índices bióticos</i>	
Monitoreo Biótico de Arroyos Patagónicos (BMPS)	Disminuye
Índice Andino Patagónico (IAP)	-

---

### **3.8. Análisis estadístico**

Para el análisis de las características ambientales se buscó identificar las diferencias en los parámetros físicos (TSS, conductividad y oxígeno disuelto) y químicos (concentración de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ , PRS) entre los distintos sitios de cada curso de agua: Ruca (R1, R2, R3), Enna (E1, E2, E3, E4) e Ingram (I1, I2, I3, I4). Dado que los supuestos del ANOVA no se cumplieron, el análisis se realizó mediante test no paramétricos (Kruskal-Wallis). Para ponderar la significación de las diferencias halladas, se realizaron comparaciones de a pares entre las medias de los rangos de los tratamientos (Sokal y Roholf 1987).

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP), sobre la base de datos ambientales de los 11 sitios (STATISTICA 10 para windows Stat Soft Inc., 2011). Los datos fueron previamente transformados (excepto pH) como  $\log(x+1)$  y las variables que presentaron una fuerte covariación (Pearson,  $p > 0,05$ ) fueron eliminadas del análisis. Quedaron seleccionadas para el análisis 9 características ambientales: cinco físicas (profundidad, ancho del lecho mojado, caudal, velocidad, TSS, conductividad, oxígeno disuelto y temperatura del agua), tres químicas ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ , PRS) y una biológica (clorofila *a*). De esta manera, se evaluó la variación de las características ambientales de los sitios y permitió ordenar los sitios en función de las mismas. El ACP se seleccionó por ser un método de ruptura o particionamiento de una matriz de similitud, la que se representa en un set de ejes ortogonales, dado que es un modelo lineal. Este método es muy útil para detectar estructuras en las relaciones de las variables analizadas (Ludwing y Reynolds 1988).

Para los ensayos de actividad MXR, tanto en la puesta a punto de la técnica de bioacumulación para las especies seleccionadas, como para los ensayos de exposición *in vitro*, los datos se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar (SD). Los valores medios se calcularon a partir de los resultados obtenidos de al menos tres grupos (unidades muestrales). El número de especímenes de cada grupo se definió en función de la talla de las especies. A modo de ejemplo, para los moluscos *P. acuta*, se consideró como un grupo al ensayo realizado con 5 moluscos por condición (control, verapamilo, droga a testear en su respectiva concentración, etc.), se registraron datos de bioacumulación de RB y la actividad MXR en términos de valor R (ver metodología 3.6.1). Para establecer si las diferencias observadas entre la acumulación del grupo control, y la acumulación del grupo verapamilo (previamente sometidos ambos al mismo tratamiento, ej. concentración de un tóxico) se utilizó el test t de Student. Para establecer si las diferencias observadas entre tratamientos fueron significativas, se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA). Se consideraron las diferencias como significativas cuando  $p < 0,05$ .

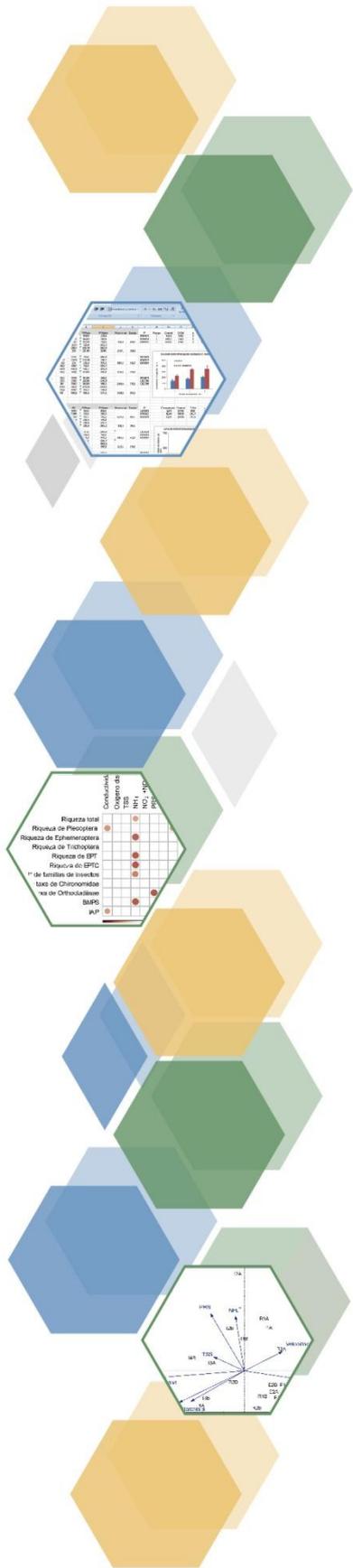
Para examinar las relaciones entre los ensambles de macroinvertebrados (111 taxa) y la base de datos ambientales, se utilizó un Análisis de Correspondencias Canónicas (ACC) en el software estadístico CANOCO (Ter Braak y Smilauer 1999). El ACC es

una técnica de análisis directo de gradientes que asume un modelo unimodal para las relaciones entre las respuestas de cada taxón al gradiente ambiental. Los ejes de ordenamiento son combinaciones lineales de las variables ambientales (ter Braak 1986). Previamente a la selección de este ordenamiento se exploraron mediante diferentes técnicas si la respuesta de los taxones era mejor interpretada con modelos lineales o unimodales (ter Braak y Smilauer 1998 1999). Los promedios ponderados de los valores medios de densidad de los taxones (basados en seis muestras de Surber por sitio) por sitio en momentos de aguas altas y bajas fueron utilizados en el análisis. Todas las variables ambientales relevantes, que podrían afectar la distribución del bentos fueron empleadas inicialmente en el ordenamiento. Tanto las variables correspondientes a la matriz de datos ambientales como las densidades de los taxones correspondientes a la matriz biótica fueron transformadas  $\log(x+1)$  antes del análisis, con el fin de aproximar su distribución a la de una distribución normal. La colinealidad de las variables fue evaluada mediante el cálculo del factor de inflación de la varianza (VIF). Aquellas variables con valores de  $VIF > 10$  (indicador de una fuerte correlación) fueron excluidas una a una del análisis, llevando a cabo el ordenamiento con las variables remanentes. La significación de los ejes fue provista por un test de permutación de Monte Carlo (Ter Braak y Smilauer 1998)

Se evaluó respuesta de los distintos métricos basados en la comunidad calculados y las variables ambientales mediante una matriz de correlación no paramétrica de Spearman. El procedimiento fue realizado utilizando el paquete corrplot (Wei y Simko 2016) en el software estadístico R versión 3.2.3 (R-Development Core Team 2016). Se utilizó un nivel de significancia de 0,05 para todas las pruebas realizadas. Esto permitió eliminar métricos redundantes y seleccionar aquellos con respuesta consistente a variables indicadoras de la calidad del agua.

Se analizó la capacidad predictora de las variables ambientales sobre los métricos de la comunidad de macroinvertebrados utilizando modelos lineales generalizados de efectos mixtos (Zuur et al. 2013). Se evaluaron seis modelos separados que incluyeron las variables ambientales como efectos fijos. Para contemplar en los modelos la estructura espacial y temporal de los datos, se incluyó el efecto aleatorio del factor sistema (factor con tres clases: Ruca, Enna e Ingram) anidado dentro del factor período hidrológico (factor con dos clases: Aguas altas y aguas bajas). Los modelos fueron

aleatorios al intercepto, permitiendo modelar la variación entre períodos hidrológicos, y entre sistemas anidados dentro del período. Se utilizó una distribución de Poisson y función de enlace log para las variables respuesta: Riqueza de EPT (R EPT), número de familias de insectos (FAM IN) y BMPS. Las variables respuesta densidad total de invertebrados (DEN TOT), densidad de colectores-recolectores (DEN CR) y densidad de taxones tolerantes (DEN TOL), por su parte, fueron modeladas mediante una distribución binomial negativa y función de enlace log. Previamente, se verificó la colinealidad de las variables ambientales mediante un análisis de correlación, eliminando variables que presentaron valores mayores al umbral predeterminado ( $r = \pm 0,5$ ). Se aplicó un abordaje automático, paso a paso hacia atrás (Backward) para la selección de los modelos, utilizando el comando “*drop1*”. Se calcularon los intervalos de confianza (IC) para los parámetros estimados, y las variables explicativas cuyos IC incluyeron el cero fueron excluidas del modelo final. Finalmente el modelado fue realizado utilizando el software R, versión 3.5.1 (R Core team 2016), utilizando los paquetes lme4 (Bates et al. 2015), MASS (Venerables y Ripley 2002) y ggplot2 (Wickham 2016), a través de RStudio versión 1.1.453 (RStudio Team 2016).



# RESULTADOS

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Caracterización ambiental de los sitios de estudio

Como la mayor parte de los ríos y arroyos de la región, los sistemas estudiados presentaron un régimen de descarga bimodal, coincidente con el período de lluvias (invierno) y el deshielo (primavera). Esto es el primer pico fue marcado y el segundo fue más leve. En términos de precipitaciones ( $994 \text{ mm.año}^{-1}$ ) el período de estudio fue regular y estuvo muy próximo a las medias históricas anuales para el área (Fig. 9). El período de aguas bajas concurrente con las menores precipitaciones fue en el verano e inicios del otoño. Los arroyos estudiados exhibieron un amplio rango de variación térmica, con una temperatura del agua entre 2,5 (E4, invierno) y 20 °C (E4, verano) (Tabla 3).

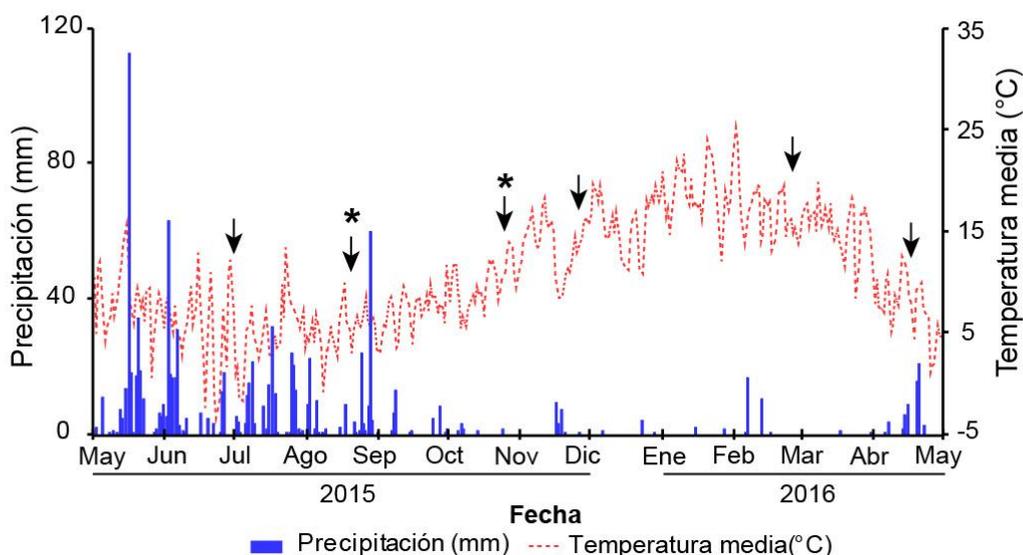


Figura 9. Precipitación diaria acumulada (mm) y temperatura media de la superficie (°C) en el área de estudio durante el período de muestreo (Mayo 2015 – Mayo 2016). Las flechas en la figura indican los días de muestreo de variables fisicoquímicas. Los asteriscos indican los momentos de muestreos del bentos.

En prácticamente todos los sitios, el tamaño de partícula del sustrato fue guijón y/o guijarro, sin embargo, una alta proporción de arena (síntoma de sedimentación) fue encontrada en los sitios semi-lénticos (humedales) (E3 y E4). La profundidad media y el ancho medio del lecho mojado varió considerablemente entre los sitios (Tabla 4). A pesar de que los sitios I1 e I2 estuvieron secos durante el verano (I1 comenzando en

Tabla 4. Variables ambientales estudiadas en sitios pertenecientes a arroyos en el Noroeste de la provincia del Chubut (Patagonia, Argentina). Los datos presentados corresponden a valores promedio (n=6), los máximos y mínimos se indican entre paréntesis.

	Arroyo Ruca			Arroyo Enna				Arroyo Ingram			
Código	R1	R2	R3	E1	E2	E3	E4	I1	I2	I3	I4
<b>Temperatura del agua (°C)</b>	9,0 (3,5-12,9)	8,4 (3,5-12,7)	8,8 (3,6-12,5)	7,9 (3,9-13,3)	8,8 (3,3-13,2)	10,8 (4,3-16,5)	10,8 (2,5-20,0)	7,1 (3,5-12,0)	9,1 (3,6-15,8)	10,5 (5,5-13,5)	11,5 (5,4-16,0)
<b>Ancho promedio del lecho mojado (m)</b>	3,9 (1,3-10,0)	3,0 (1,6-4,5)	4,6 (1,2-13,8)	4,5 (3,2-5,5)	2,6 (2,0-3,1)	n/c	n/c	2,2 (0-2,6)	2,9 (1-4,1)	8,3 (7,0-10,3)	11,8 (7,0-22,0)
<b>Profundidad (cm)</b>	16,0 (10,0-21,3)	13,0 (5,5-23,0)	13,0 (1,0-19,7)	16,6 (11,5-23,0)	29,4 (13,0-39,0)	n/c	n/c	19,8 (0-23,4)	16,1 (0-27,8)	23,8 (16,2-27,9)	18,6 (9,4-28,2)
<b>Velocidad (m.s<sup>-1</sup>)</b>	0,44 (0,10-0,67)	0,57 (0,10-0,97)	0,41 (0,10-0,67)	0,36 (0,12-0,23)	0,33 (0,12-0,57)	n/c	n/c	0,21 (0-0,33)	0,49 (0-0,24)	0,34 (0,11-0,56)	0,29 (0,20-0,41)
<b>Caudal (m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>)</b>	0,40 (0,01-1,22)	0,43 (0,01-0,89)	0,48 (0,01-1,81)	0,28 (0,06-0,44)	0,25 (0,06-0,48)	n/c	n/c	0,08 (0-0,10)	0,27 (0-0,55)	0,64 (0,21-1,27)	0,73 (0,21-1,71)
<b>Granulometría del sustrato</b>	Guijón	Guijón	Guijarro	Guijón	Guijarro	Gránulo/ Arena	Arena	Guijarro/ Gránulo	Guijón	Guijón	Guijón/ Guijarro
<b>pH</b>	6,4 (5,5-7,3)	5,9 (5,0-6,5)	6,7 (5,8-7,8)	7,0 (5,9-8,0)	6,6 (6,5-6,6)	6,7 (6,0-7,0)	7,2 (6,6-8,2)	6,5 (6,3-6,7)	6,7 (6,5-6,9)	6,9 (6,6-7,2)	6,5 (6,1-6,9)

Noviembre, e I2 iniciando en Enero), estos mostraron un caudal alto durante el invierno y la primavera. Dado que el canal derivador estuvo activo durante los meses de verano, los sitios I3 e I4, en la zona baja del arroyo Ingram, presentaron agua aún en la temporada seca, entre los meses de Noviembre 2015 y Abril 2016 ( $0,21 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ ).

Los valores medios de conductividad eléctrica variaron entre  $46,6$  y  $49,4 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$  (R1 a R3), entre  $53,3$  y  $109,2 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$  (E1 a E4) y entre  $56,5$  y  $198,3 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$  (I1 a I4) (Fig. 10). Las diferencias observadas fueron significativas al comparar los sitios de referencia vs los sitios disturbados (Tabla 5).

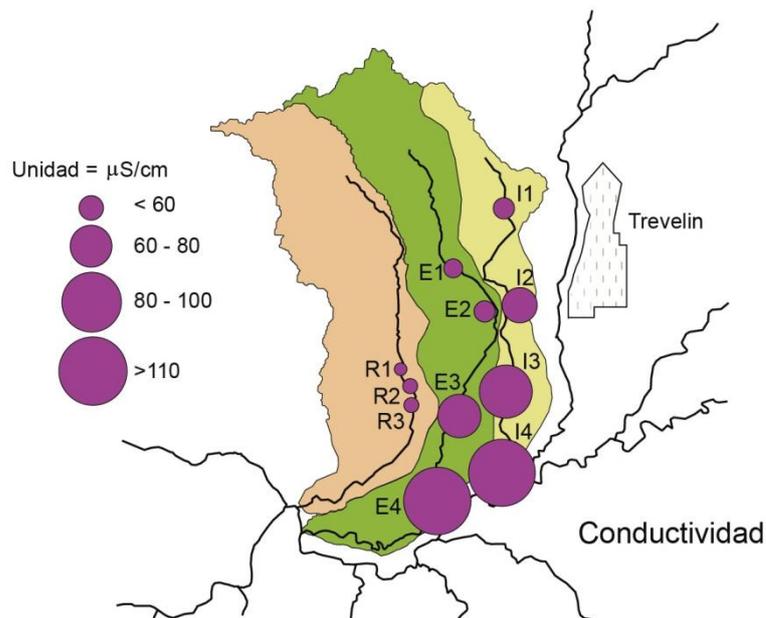


Figura 10. Conductividad eléctrica promedio del agua ( $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) por sitio para los arroyos Ruca, Enna e Ingram (Noroeste de la Provincia de Chubut, Patagonia, Argentina).

A lo largo del arroyo Ruca, los valores medios de oxígeno disuelto variaron entre  $11,48$  y  $11,34 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  (R1 y R3, respectivamente), en el arroyo Enna variaron entre  $11,92$  y  $10,65 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  (E1 y E4, respectivamente) y finalmente en el arroyo Ingram oscilaron entre  $12,85$  y  $10,33 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  (I1 e I4, respectivamente) (Fig. 11). El sitio I3 presentó una declinación del valor medio de oxígeno disuelto con respecto al resto del sistema Ingram ( $8,08 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ), y dicha disminución resultó significativa. Asimismo, cuando se analizan en conjunto, todos los sitios de referencia presentaron también más oxígeno disuelto que los sitios disturbados (Ref > Dist) (Tabla 5).

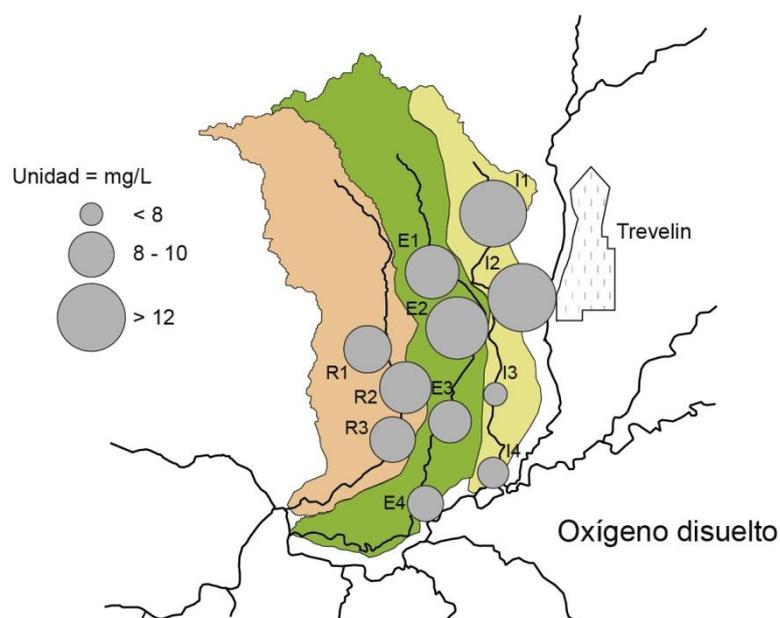


Figura 11. Concentración de oxígeno disuelto promedio ( $\text{mg.l}^{-1}$ ) en los arroyos Ruca, Enna e Ingram (Noroeste de la Provincia de Chubut, Patagonia, Argentina).

Los valores de TSS no mostraron patrones particulares de variación espacial. Sin embargo pudo apreciarse un aumento de esta variable en los sitios aguas abajo del arroyo Enna (E3 y E4), que presentaron características de sistemas semi-lénticos (Fig. 12).

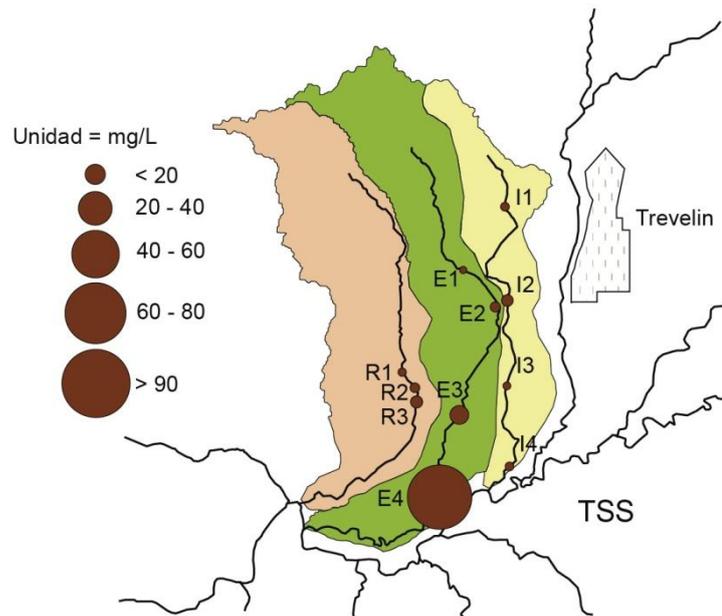


Figura 12. Total de Sólidos en Suspensión ( $\text{mg.l}^{-1}$ ) en los arroyos Ruca, Enna e Ingram (Noroeste de la Provincia de Chubut, Patagonia, Argentina).

Con respecto a los niveles medios de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$  y PRS, los sitios del arroyo Ruca no mostraron diferencias significativas entre sí (Fig. 13). Los sitios del arroyo Enna por su parte, sí mostraron un aumento en las concentraciones medias de  $\text{NH}_4^+$  aguas abajo, siendo los valores en E4 significativamente mayores que los registrados en E1 y E2 (Tabla 5). En el caso de PRS los valores observados en E4 fueron mayores que los de E2 (Tabla 5, Fig. 13C). Con respecto al arroyo Ingram no se observaron diferencias significativas en los valores medios de ninguno de los nutrientes, sin embargo se registró un valor máximo de  $\text{NH}_4^+$  en el sitio I2 ( $230 \mu\text{g.l}^{-1}$ ) y un aumento de los niveles medios de  $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$  después de la introducción de agua por medio de la derivación del Río Percy entre el sitio I2 e I3 (Fig. 13B).

Los valores medios de clorofila *a* y de bacterias *Escherichia coli* se observan en la Figura 14. Los arroyos Ruca e Ingram mostraron un aumento escalonado aguas abajo en la concentración de clorofila *a* y *E. coli*. Si bien esta tendencia no se replicó en el arroyo Enna, sí pudo apreciarse un incremento en la cantidad de bacterias presentes en el sitio E3 con respecto a los sitios previos en el mismo sistema. El conteo de *E. coli* presentó valores entre 7,7 UFC en I2 (Agosto) y 700 UFC en I3, I4 (Agosto), I3, E3, R3

(Octubre) e I4 (Noviembre), siendo estos últimos los máximos valores obtenidos a lo largo del estudio.

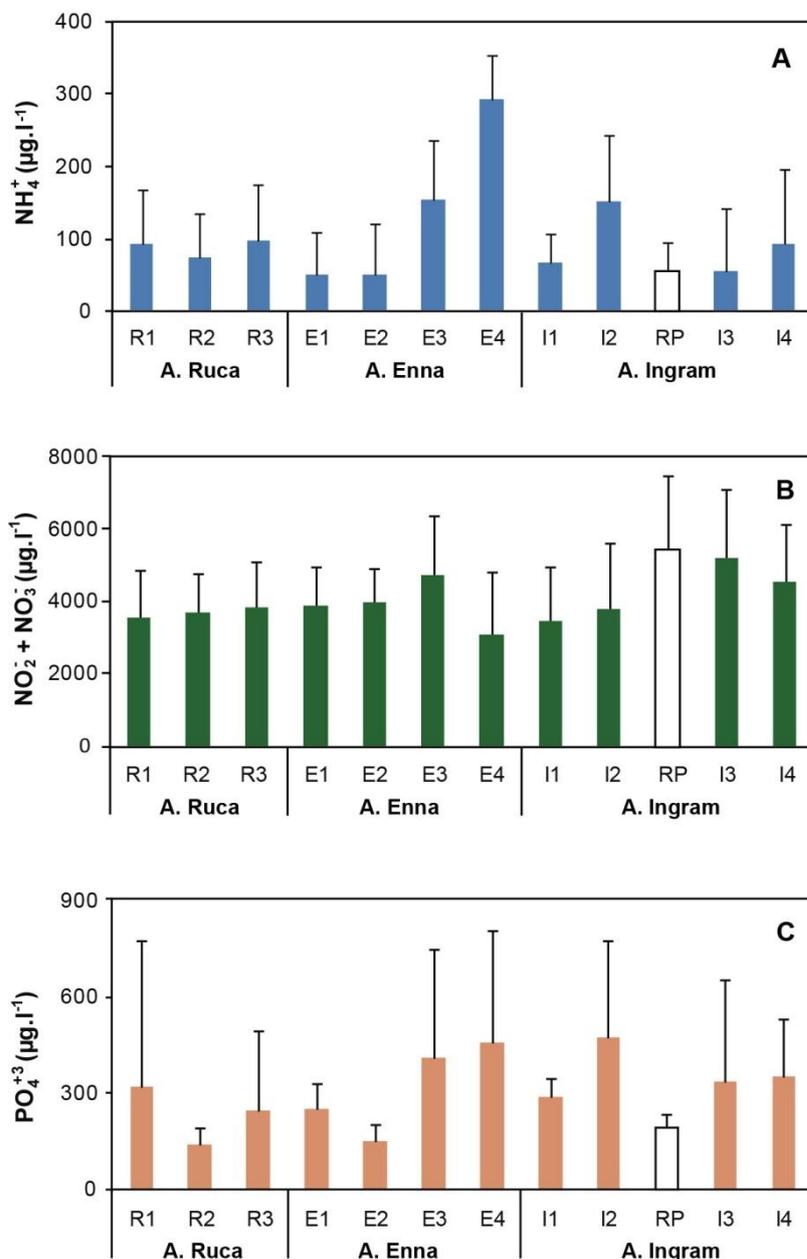


Figura 12. Valores medios de los principales parámetros químicos del agua en los sitios de estudio en los arroyos Ruca, Enna e Ingram. A)  $\text{NH}_4^+$ , B)  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ , C) FRS. Los códigos de los sitios se encuentran en la Tabla 1 (metodología). Se incluye también los valores correspondientes al sitio del Río Percy de donde se toma agua para el canal derivador que es vertido entre los sitios I2 e I3. Las barras indican los desvíos estándar.

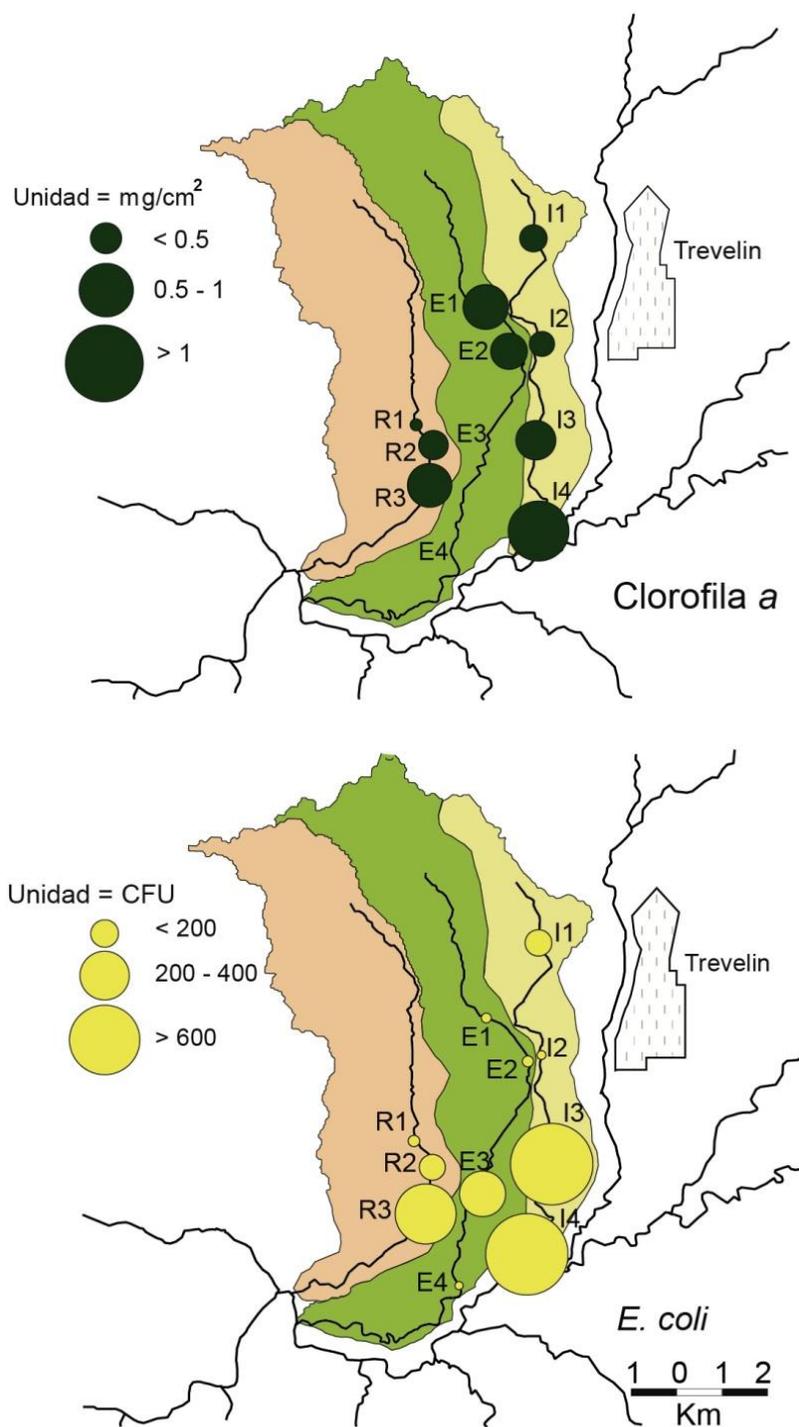


Figura 14. Tendencias en las variables Clorofila *a* (superior) y *E. coli* (inferior) promedio para los arroyos Ruca, Enna e Ingram (Noroeste de la Provincia de Chubut, Patagonia, Argentina).

Tabla 5. Resultados de las comparaciones múltiples según Kruskal Wallis y pruebas no paramétricas apareadas de Mann Whitney, para las variables ambientales medidas en los sitios estudiados en los arroyos Ruca, Enna e Ingram (Noroeste de la provincia de Chubut, Patagonia, Argentina). Ref: Referencia, Dist: Disturbados. Solo se presentan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). ns: no significativo.

Variable	Arroyo Ruca	Arroyo Enna	Arroyo Ingram	Todos los sitios (Ref vs Dist)
<b>Conductividad</b>	ns	E1, E2 < E4	I1 < I4	Ref < Dist
<b>TSS</b>	ns	E1 < E3, E4	I2 < I3	Ref < Dist
<b>O<sub>2</sub></b>	ns	ns	I2 > I3	Ref > Dist
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	ns	E1, E2 < E4	ns	ns
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	ns	ns	ns	ns
<b>PRS</b>	ns	E2 < E4	ns	ns

El análisis de componentes principales (ACP) reveló que los datos químicos, físicos y biológicos proveyeron una clara distinción entre los arroyos de acuerdo al gradiente de disturbio y también revelaron la variabilidad estacional (Fig. 15 y Tabla 6). Los dos primeros factores explicaron la mayor parte de la variación en el conjunto de datos (63,8%). El eje ACP1 (44,8%) resalta el gradiente de disturbio (i.e., componentes positivas altas para TSS, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y conductividad) y también los cambios en los atributos del caudal según la estación. (i.e., componentes negativas para el ancho del lecho mojado, caudal, profundidad y velocidad) (Tabla 6). Por esto, la mayoría de los sitios de referencia que presentaron mejores condiciones de calidad del agua estuvieron posicionados a la izquierda del eje ACP1 y los sitios más degradados a la derecha del mismo. El eje ACP2 (19%) subrayó un gradiente en enriquecimiento de nutrientes y eutrofización (i.e., cargas positivas para PRS y clorofila *a*).

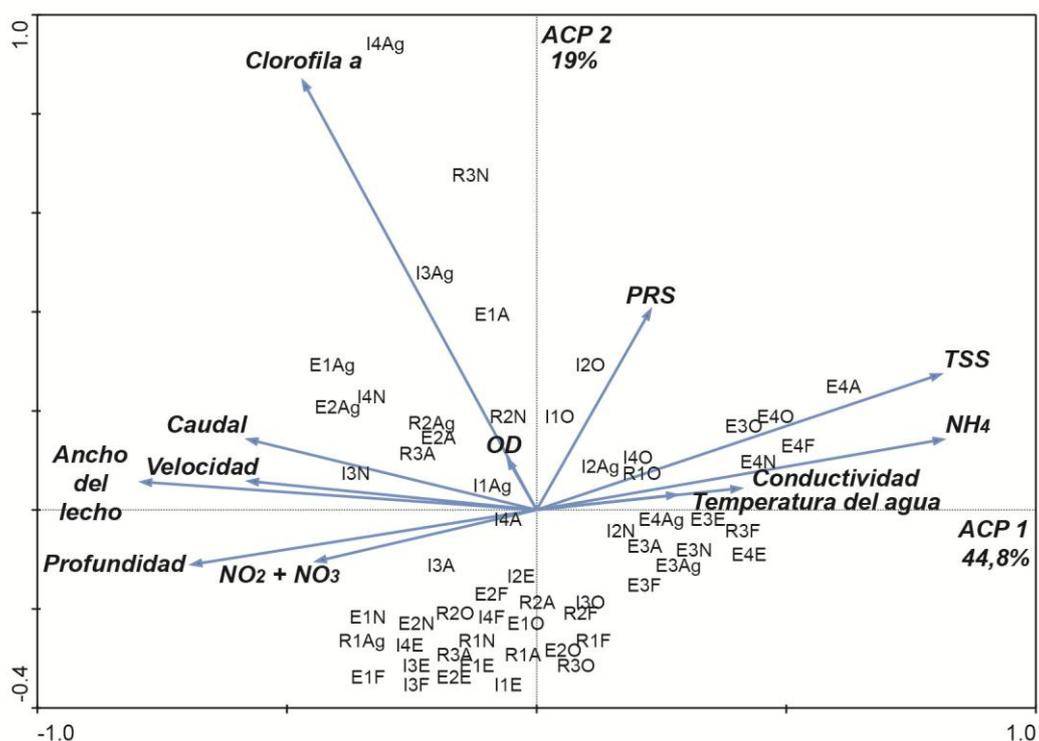


Figura 15. Ordenamiento de los sitios según ACP en las variables ambientales medidas en los arroyos Ruca (R), Enna (E) e Ingram (I) y los números corresponden a los sitios de muestreo (Noroeste de la provincia de Chubut, Patagonia, Argentina) entre julio de 2015 y abril de 2016. Los códigos de los sitios se encuentran en la Tabla 1 y la explicación de la varianza y los componentes de cada variable se encuentran en la Tabla 6. (J: julio, Ag: Agosto, O: octubre, N: Noviembre / Diciembre, E: Enero, F: Febrero y A: Abril). TSS: Total de sólidos en suspensión, NH<sub>4</sub>: Amonio, NO<sub>2</sub>-NO<sub>3</sub>: Nitritos + Nitratos y PRS: Fósforo reactivo soluble.

Tabla 6. Coeficientes de correlación de las variables ambientales en el ACP, Autovalores y varianza explicada (ejes 1 y 2) para las variables retenidas en el ordenamiento correspondiente a los sitios de estudio de los arroyos Ruca, Enna e Ingram (Noroeste de la provincia del Chubut, Patagonia, Argentina).

<b>Variable</b>	<b>ACP 1</b>	<b>ACP 2</b>
Temperatura del agua	0,28	0,03
Conductividad	0,41	0,04
Oxígeno disuelto (OD)	-0,06	0,10
TSS	0,81	0,27
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,81	0,14
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-0,44	-0,10
PRS	0,23	0,40
Clorofila <i>a</i>	-0,47	0,87
Profundidad	-0,69	-0,11
Velocidad	-0,58	0,06
Ancho del lecho mojado	-0,79	0,06
Caudal	-0,58	0,14
Autovalores	0,448	0,190
Varianza explicada acumulada (%)	44,8	63,8

## 4.2 Composición y cobertura de la vegetación acuática

Se registraron un total de 14 taxones de macrófitas (Tabla 7) y la riqueza total varió entre 0 (R1, R3, I2) a 8 (I3) taxones por sitio. Las especies más frecuentes fueron *Veronica anagallis-aquatica*, *Mimulus glabratus*, *Callitriche lechleri* y *Myriophyllum quitense*. Cuando estuvo presente *M. quitense* contribuyó con una alta cobertura (> a 30 %, excepto en I4) (Fig. 16).

Del total de taxones encontrados, 5 de ellos resultaron ser especies nativas, 3 de ellos resultaron exóticas, 3 endémicas, y un taxón cosmopolita. Predominaron los taxones de hábito emergente por sobre las de hábito sumergido y flotante.

Tabla 7. Inventario de macrófitas presentes en los sitios de estudio. Se detallan origen (Nat.: Nativo, End.: Endémica, Exot.: Exótica, Cos.: Cosmopolita), hábito: (Em.: Emergente, Fl.: flotante libre, Sum.: sumergida) y formas de vida (P: Perenne, A: Anual/bianual). El muestreo fue realizado en Septiembre/2017.

Taxa	Origen	Hábito	Forma de vida
<b>Cyperaceae</b>			
<i>Eleocharis melanomphala</i> C.B. Clarke	End.	Em.	P
<i>Eleocharis pseudoalbibracteata</i> S. González & Guagl.	End.	Em.	P
<i>Schoenoplectus californicus</i> (C.A. Mey.) Soják	Nat.	Em.	P
<b>Characeae</b>			
<i>Nitella</i> sp.		Sum.	
<b>Haloragaceae</b>			
<i>Myriophyllum quitense</i> Kunth.	Nat.	Sum.	P
<b>Juncaceae</b>			
<i>Juncus</i> sp.		Em.	P
<i>Juncus pallescens</i> Lam.	Nat.	Em.	P
<b>Lemnaceae</b>			
<i>Lemna gibba</i> L.	Cos.	Fl.	A
<b>Phrymaceae</b>			
<i>Erythranthe glabrata</i> (Kunth) G.L. Nesom	Nat.	Em.	A
<b>Plantaginaceae</b>			
<i>Callitriche lechleri</i> (Hegelm.) Fassett.	End.	Sum.	A
<i>Callitriche truncata</i> Guss.	Exot.	Sum.	A
<i>Veronica anagallis-aquatica</i> L.	Exot.	Em.	A
<i>Veronica serpyllifolia</i> L.	Exot.	Em.	P

Ranunculaceae			
<i>Ranunculus flagelliformis</i> Sm.	Nat.	Sum.	A

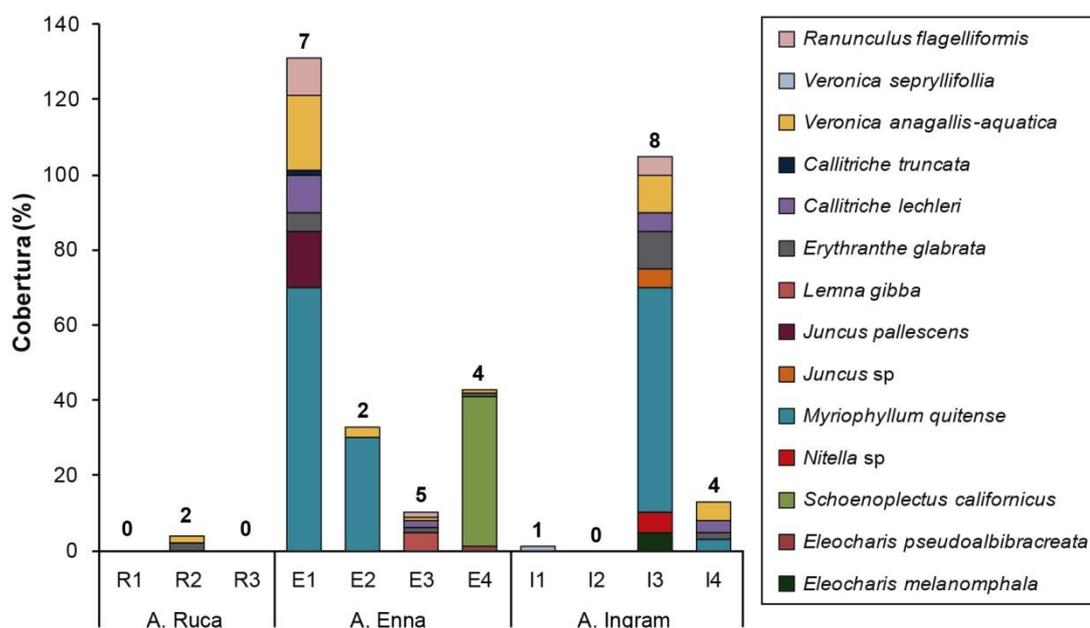


Figura 16. Porcentaje de cobertura de macrófitas por sitio de estudio para los arroyos Ruca, Enna e Ingram (NO de la Provincia de Chubut, Patagonia, Argentina). La riqueza absoluta de especies para cada sitio se encuentra indicada por los números sobre las barras.

### 4.3 Composición de la vegetación ribereña

En la vegetación de la ribera y la matriz de los sitios de estudio se encontraron un total de 29 taxones, 13 de ellos fueron especies herbáceas, 6 arbustivas y 10 arbóreas (Tabla 8). En todos los sitios predominaron las especies exóticas por sobre las nativas y las salicáceas estuvieron presentes en el 100% de los sitios estudiados. Las riberas de los sitios de referencia de los tres arroyos (R1, E1 e I1) mostraron una mayor riqueza de especies que sus respectivos sitios aguas abajo. Los sitios E1, I1 fueron los que tuvieron una mayor cantidad de especies con 11 y 10 taxones respectivamente. Mientras que los sitios I4, R3 y E4 mostraron 5, 3 y 2 especies respectivamente.

Tabla 8. Inventario de vegetación herbácea, arbustiva y arbórea por sitio de muestreo en los Arroyos Ruca, Enna e Ingram en el Noroeste del Chubut (Patagonia Argentina). R: Ribera, M: Matriz. Código de símbolos: ● vegetación nativa, ● vegetación exótica. El relevamiento de vegetación fue realizado en el mes de Septiembre/2017.

Taxa	R1		R2		R3		E1		E2		E3		E4		I1		I2		I3		I4	
	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M
<b>Estrato herbáceo</b>																						
<i>Acaena magellanica</i> (Lam.) Vahl							●								●							
<i>Achillea millefolium</i> L.															●							
Poaceae spp.	●		●				●		●	●			●	●	●		●		●			●
<i>Verbascum thapsus</i> L.									●										●			
<i>Mentha aquatica</i> L.																			●			
<i>Juncus procerus</i> E. Mey.							●															
<i>Medicago lupulina</i> L.							●															
<i>Crepis capillaris</i> (L.) Wallr.																						
<i>Erodium cicutarium</i> (L.) L'Hér. ex Aiton							●															
<i>Conium maculatum</i> L.									●						●	●						●
<i>Arctium minus</i> (Hill) Bernh.									●													
<i>Brassica rapa</i> L.									●													
<b>Estrato arbustivo</b>																						
<i>Artemisia absinthium</i> L.															●			●	●			
<i>Ochetophila trinervis</i> (Gillies ex Hook. & Arn.) Poepp. ex							●	●							●	●						●
<i>Schinus patagonicus</i> (Phil.) I.M. Johnst. ex Cabrera							●								●	●						
<i>Berberis microphylla</i> G. Forst.							●	●							●	●						●
<i>Rosa rubiginosa</i> L.				●			●				●				●	●	●	●	●			●
<i>Diostea juncea</i> (Gillies & Hook.) Miers								●														
<i>Cytisus scoparius</i> (L.) Link	●	●	●																			

Continuación

Taxa	R1		R2		R3		E1		E2		E3		E4		I1		I2		I3		I4	
	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M
<b><i>Estrato arbóreo</i></b>																						
<i>Salix</i> spp.	•		•		•	•	•		•	•		•	•	•	•	•		•	•	•	•	•
<i>Austrocedrus chilensis</i> (D. Don) Pic. Serm. & Bizzarri								•								•						
<i>Maytenus boaria</i> Molina								•								•						
<i>Populus</i> sp.												•						•		•		•
<i>Cupressus macrocarpa</i> Hartw. ex Gord	•	•															•					
<i>Betula pendula</i> Roth		•					•												•			
<i>Pseudotsuga menziesii</i> (Mirb.) Dougl.				•	•			•											•			•
<i>Pinus radiata</i> D. Don		•				•						•										
<i>Pinus ponderosa</i> Douglas ex Laws & Laws	•	•	•																			
<i>Pinus contorta</i> Douglas ex Loud			•	•	•	•																

#### 4.4 Índice de calidad de hábitat (ICH) e Índice de calidad de ribera (QBRp)

Los valores del índice de calidad de hábitat (ICH) fluctuaron entre 83 (marginal) y 180 (óptimo) puntos. Todos los sitios de referencia (R1, E1 y I1) presentaron una valoración óptima para la calidad de hábitat (> 150 puntos), siendo el sitio I1 el de mejor condición (180 puntos) (Fig. 17). Los sitios R1 y E1 por su parte, presentaron valores de ICH más bajos, debido a una disminución en los apartados de alteración del canal, estabilidad del lecho del río, y ancho de la zona de vegetación ribereña. La peor situación se observó en los sitios R3 e I4, donde las principales alteraciones fueron la erosión de las márgenes debido a la remoción de la vegetación, un alto nivel de incrustación debido a la sedimentación, y pérdida de la disponibilidad de sustrato epifaunal. Dado que el ICH es aplicable a ríos y arroyos, no fue calculado para los sitios E3 y E4, dado que estos son mallines conectados.

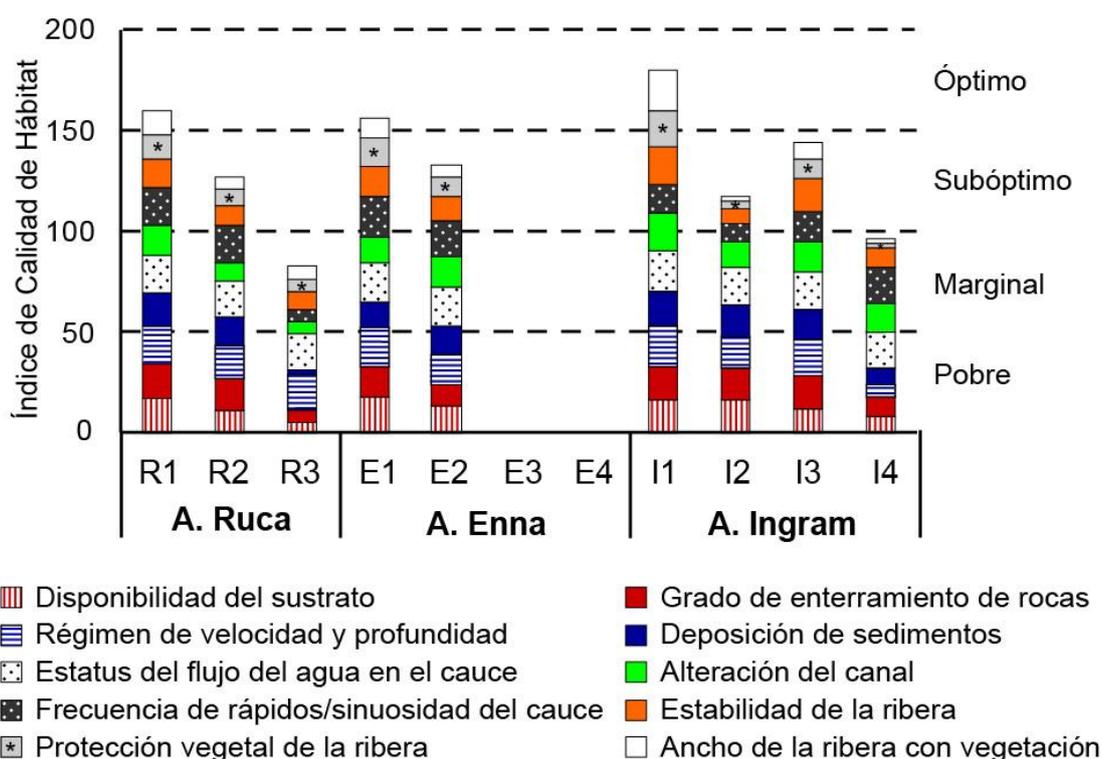


Figura 17. Índice de Calidad de Hábitat de cada sitio ubicado en los arroyos Ruca, Enna e Ingram (Noroeste de la Provincia de Chubut, Patagonia, Argentina) (Noviembre/2015). Se indican los juicios de calidad obtenidos y las líneas de corte entre categorías.

Los valores de QBRp mostraron que los sitios ubicados río arriba, con escasos o nulo uso agrícola, presentaron una buena calidad de sus ecosistemas de ribera, mientras que los sitios R2, E2, E4, I2 e I3 presentaron alguna alteración en el corredor ribereño. Los sitios más degradados fueron R3, E3 e I4, los cuales presentaron una fuerte alteración del corredor ribereño, entre otros por pérdida de la complejidad y naturalidad de la vegetación debido al pastoreo por presencia de ganado en el área de ribera (Fig. 18).

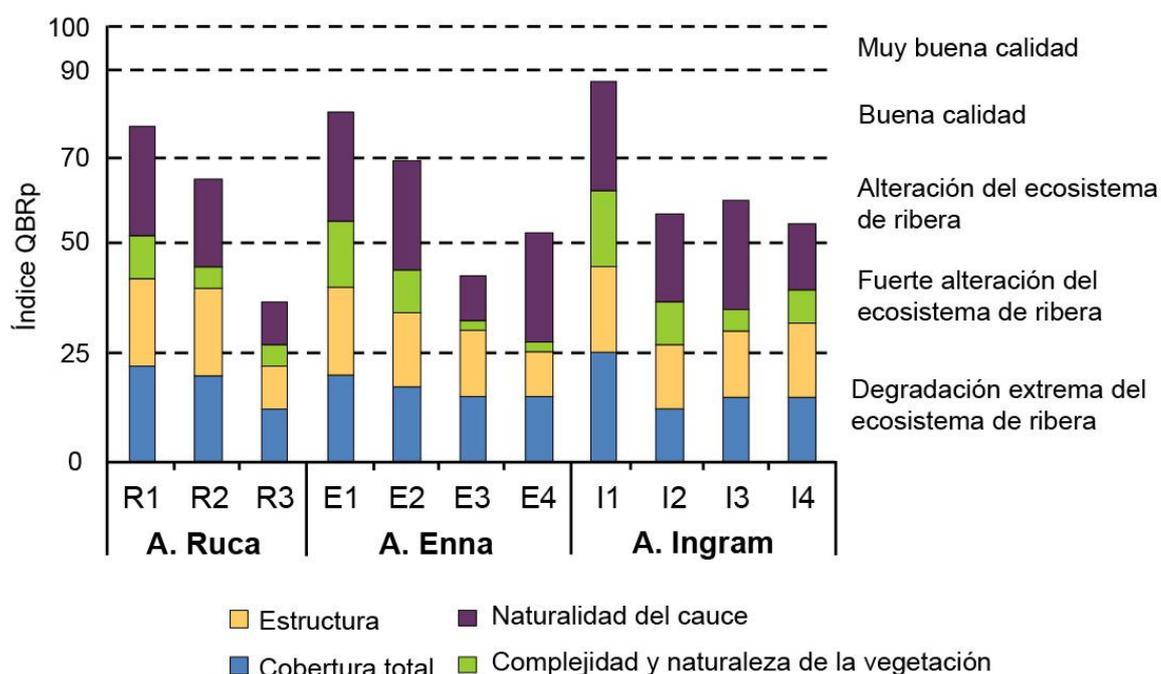


Figura 18. Condición del ecosistema de ribera (QBRp) de cada sitio ubicado en los arroyos Ruca, Enna e Ingram (Noroeste de la Provincia de Chubut, Patagonia, Argentina) (Noviembre/2015). Se indican los juicios de calidad obtenidos y las líneas de corte entre categorías.

#### 4.5 Actividad MXR

Donde estuvieron presentes, se realizó una evaluación del sistema MXR en moluscos de agua dulce *Chilina dombeiana* (nativo) y *Physa acuta* (exótico) provenientes de los sitios de muestreo E1, E2, E3, I3 e I4 para la primera especie mencionada y E3, E4, I3 e I4, para la segunda.

Antes de poder realizar una valoración de este sistema como biomarcador en los organismos provenientes de los sitios de muestreo, fue necesario realizar una caracterización del mismo y una puesta a punto de la técnica de acumulación de sustrato fluorescente utilizada, dado que no se conocía la actividad de este sistema en la especie *C. dombeiana*. Como se explicó en la metodología, se evaluó la actividad MXR como la acumulación del sustrato fluorescente Rodamina B, en ausencia (control) y presencia de un inhibidor específico de Pg-P, el verapamilo. También se utilizó el valor R, es decir, la relación entre la acumulación de RB en condiciones control y en presencia de verapamilo (acumulación Control / acumulación verapamilo) como un índice de dicha actividad. Cabe recordar que valores próximos a 1 del valor R indican una baja actividad del sistema, y valores R próximos a 0 indican una alta actividad del mismo.

##### 4.5.1 Caracterización del sistema MXR en moluscos *Chilina dombeiana* y *Physa acuta*.

###### *Evaluación de los tiempos de exposición a RB y verapamilo*

Para determinar el tiempo óptimo de incubación con el sustrato fluorescente, se evaluó la acumulación de RB (5  $\mu$ M) en relación al tiempo de exposición al mismo, en presencia y ausencia del inhibidor. Para ello se incubaron grupos de organismos de ambas especies, en las condiciones mencionadas durante 2, 4 y 6 h. Si bien los resultados de estos ensayos mostraron un leve incremento de la acumulación de RB en condiciones control en relación al tiempo de exposición, ésta diferencia no fue significativa para ninguna de las especies estudiadas ( $p > 0.05$ ,  $n = 3$ ) (Fig. 19). Al analizar los valores del índice R obtenidos a partir de las acumulaciones de RB en presencia y ausencia del inhibidor, se pudo observar que el tiempo que permitió detectar la mayor actividad de MXR (menor valor del índice R) fue de 4 h (Tabla 9) en *P. acuta* y entre las 4 y 6 h para *Ch. dombeiana*. Tampoco pudo apreciarse una diferencia

estadísticamente significativa en los datos del índice R para ninguna de las dos especies estudiadas.

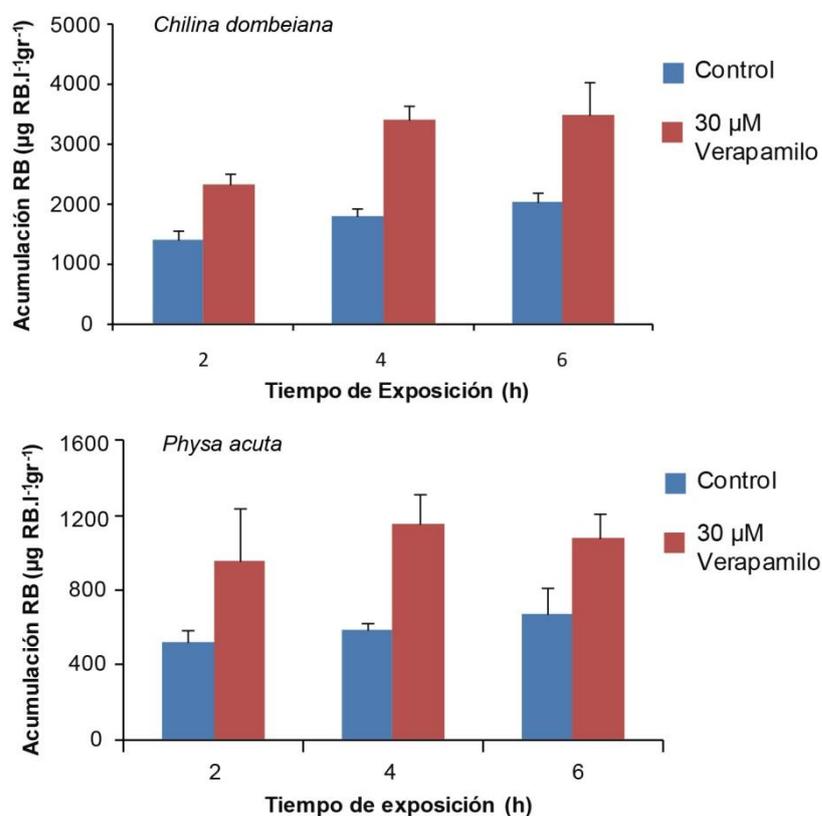


Figura 19. Evaluación de la acumulación de RB en función del tiempo de exposición en *C. dombeiana* (superior) y *P. acuta* (inferior). La acumulación de RB fue medida en ausencia (control) y presencia de 30 µM de verapamilo, para tres tiempos de incubación diferentes. Las barras representan el error estándar (n = 3).

Tabla 9. Evaluación del valor R en función del tiempo de exposición en *C. dombeiana* y *P. acuta*. El valor R fue obtenido como la relación entre la acumulación de RB en ausencia y presencia del inhibidor y fue evaluada en ambas especies para los tres tiempos de incubación. Se indican los valores R promedios (n = 3) y el error estándar (EE).

Tiempo (h)	<i>Chilina dombeiana</i>		<i>Physa acuta</i>	
	Valor R	EE	Valor R	EE
2	0,62	0,12	0,61	0,11
4	0,53	0,02	0,52	0,04
6	0,53	0,00	0,66	0,19

### ***Ensayo de bioacumulación de Rodamina B a distintas concentraciones***

Moluscos de ambas especies fueron incubados en medios con concentraciones 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$  de RB con el fin de determinar la concentración óptima de sustrato fluorescente a utilizar durante los ensayos subsiguientes. La figura 20 indica que el sistema MXR fue efectivo al transportar todas las concentraciones de RB evaluadas y que la acumulación de RB se incrementó al aumentar la concentración del sustrato fluorescente en el medio para ambas especies (Fig. 20). Tanto para *C. dombeiana* como para *P. acuta*, los organismos que fueron incubados con 5 y 10  $\mu\text{M}$  de RB en presencia del inhibidor del sistema MXR (30  $\mu\text{M}$  verapamilo) acumularon más RB que aquellos que fueron incubados solo en presencia del fluorescente ( $p < 0.05$ , *C. dombeiana* n=3, *P. acuta* n=5). Por el contrario, utilizando RB 1  $\mu\text{M}$  no se logró evidenciar una diferencia en la acumulación del sustrato en presencia o ausencia de verapamilo, en ninguna de las dos especies.

Al analizar los valores R para las diferentes concentraciones de RB (Tabla 10) se puede apreciar que no hubo diferencias significativas en la actividad de MXR obtenida en los organismos expuestos a concentraciones de 5 y 10  $\mu\text{M}$  para ninguna de las dos especies estudiadas

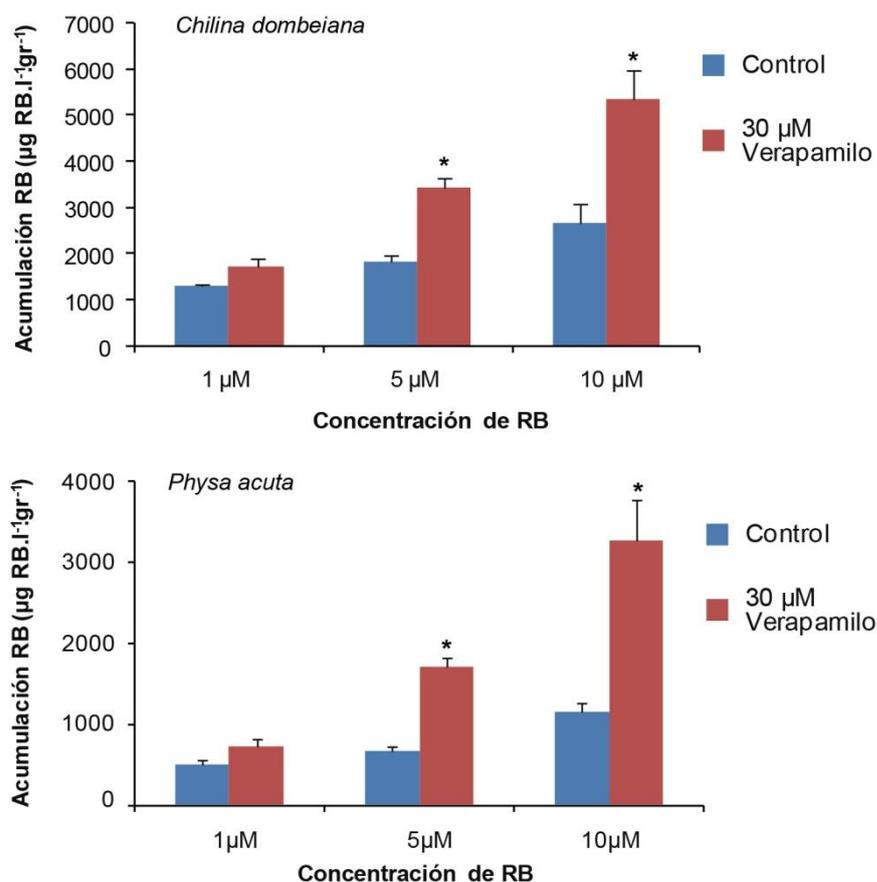


Figura 20. Evaluación de la acumulación de RB en función de la concentración de RB en el medio de incubación en *C. dombeiana* (superior) y *P. acuta* (inferior) dentro de las 24 h de colecta. La acumulación de RB fue evaluada en condiciones control y con el inhibidor verapamilo (30 µM), en presencia de concentraciones crecientes de RB. Se grafican los valores promedio de acumulación y las barras representan el error estándar (*C. dombeiana* n = 3, *P. acuta* n = 5). El símbolo (\*) indica una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto del control.

Tabla 10. Evaluación del valor R en función de la concentración de RB en el medio de incubación en *C. dombeiana* y *P. acuta*. El valor R fue obtenido como la relación entre la acumulación de RB en ausencia y presencia del inhibidor y fue evaluada para tres concentraciones diferentes de RB. Se indican los valores R promedios (*C. dombeiana* n = 3, *P. acuta* n = 5) y el error estándar (EE). Las letras minúscula que acompañan los valores indican diferencias significativas entre los grupos analizados (ANOVA, p < 0,05)

Concentración RB (µM)	<i>Chilina dombeiana</i>		<i>Physa acuta</i>	
	Valor R	ES	Valor R	ES
1	0,75a	0,05	0,71a	0,10
5	0,53b	0,05	0,40b	0,03
10	0,49b	0,04	0,38b	0,05

***Ensayo de bioacumulación de RB en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor verapamilo***

Se analizó la acumulación de RB en relación a la exposición de los organismos *C. dombeiana* y *P. acuta* en concentraciones crecientes del inhibidor verapamilo. Si bien el análisis estadístico de los valores de acumulación no indicó una diferencia significativa a partir de concentraciones de 10 µM de verapamilo en el medio, las figuras 20 muestran que dichos valores tendieron a estabilizarse entre las concentraciones de 30 y 50 µM del inhibidor, alcanzando el máximo efecto para ambas especies (Fig. 21).

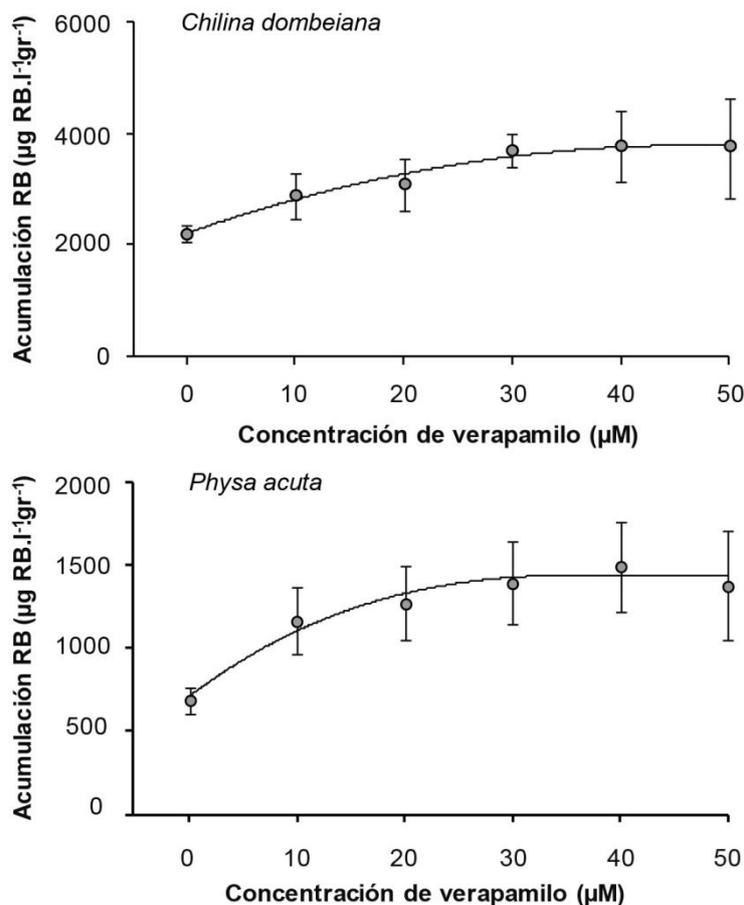


Figura 21. Acumulación de RB en función de la concentración del inhibidor verapamilo en *C. dombeiana* y *P. acuta* dentro de las 24 h de colecta. Los puntos indican los valores de acumulación promedio y las barras representan el error estándar (*C. dombeiana* n = 3, *P. acuta* n = 4).

#### 4.5.2 Actividad MXR evaluada en organismos acuáticos presentes en los sitios de muestreo asociados a prácticas agropecuarias.

##### *Actividad MXR de Chilina dombeiana en campo*

La actividad del sistema MXR fue evaluada en moluscos de la especie *Ch. dombeiana* provenientes de los sitios de muestreo E1, E2 y E3 ubicados sobre el Arroyo Enna. Los ensayos de bioacumulación evidenciaron una disminución de la concentración intracelular de RB en condiciones control para el sitio E3 con respecto al E2. Además, en todos los sitios se observó una diferencia significativa entre dicha acumulación y la obtenida en presencia de verapamilo (Fig. 22A). Sin embargo, al

analizar los valores R que surgen a partir de dichos datos, se puede apreciar que no existieron diferencias en los niveles de actividad MXR (cerca de 0,7) entre los tres sitios de este arroyo (Fig. 22B).

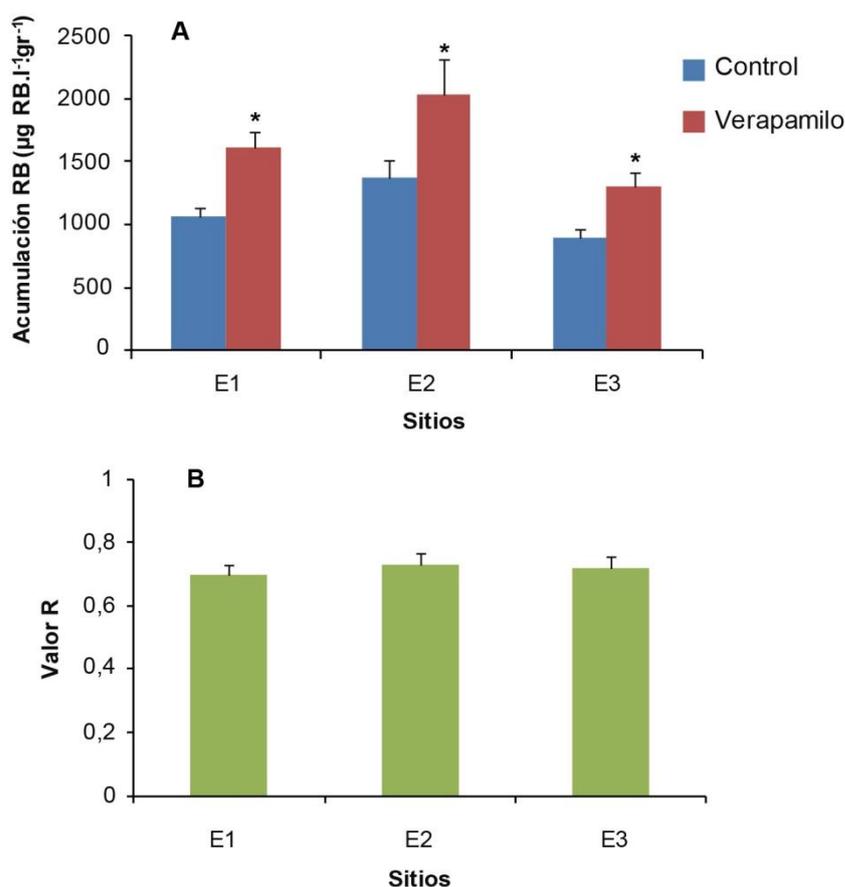


Figura 22. Evaluación de la acumulación de RB (A) y valores R (B) en organismos de la especie *C. dombeiana* provenientes de sitios sobre el Arroyo Enna (Noroeste de la Provincia de Chubut, Patagonia, Argentina). Se grafican los valores promedios de cada variable y las barras indican el error estándar (E1 n = 56, E2 n = 52, E3 n = 48). El símbolo (\*) indica una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al control.

Al evaluar la actividad MXR en individuos de la especie *C. dombeiana* provenientes de los sitios I3 e I4, se observó una acumulación de RB en condiciones control similar en ambos sitios que se incrementó en presencia del inhibidor (Fig. 23A). Este aumento no difirió entre los sitios antes mencionados, tal como puede apreciarse al analizar los valores R para ambos sitios ( $p > 0,05$ ) (Fig. 23B).

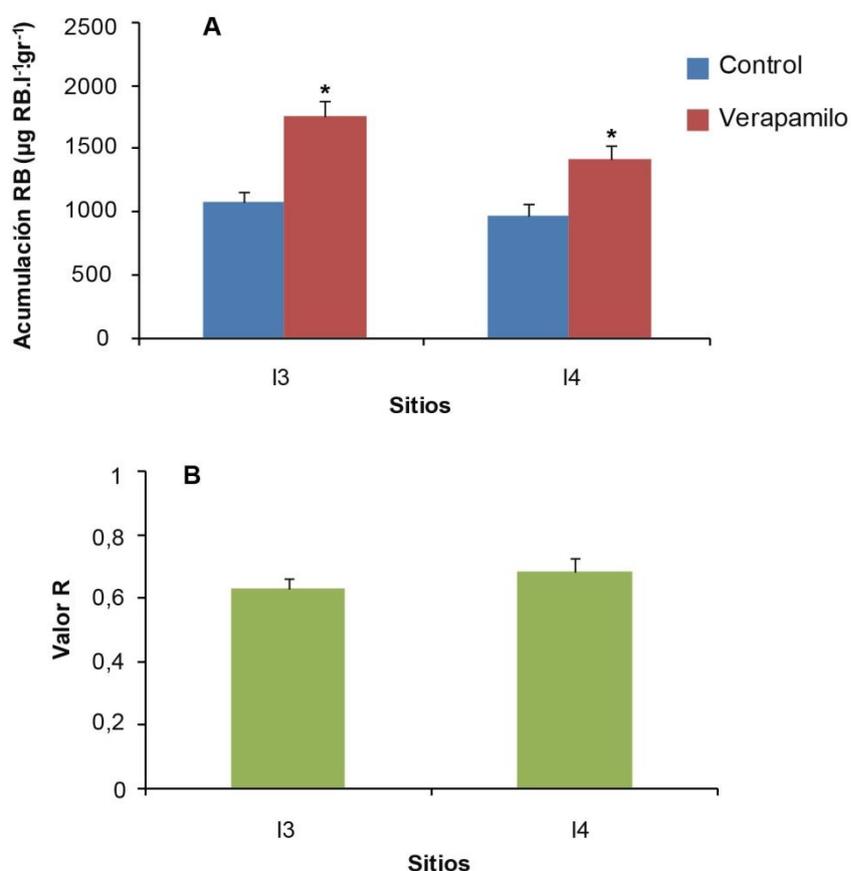


Figura 23. Evaluación de la acumulación de RB (A) y valores R (B) en organismos de la especie *C. dombeiana* provenientes de sitios sobre el Arroyo Ingram (Noroeste de la Provincia de Chubut, Patagonia, Argentina). Se grafican los valores promedios de cada variable y las barras indican el error estándar (I3 n = 30, I4 n = 22). El símbolo (\*) indica una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al control.

### ***Actividad MXR de Physa acuta en campo***

La actividad de MXR evaluada en moluscos de la especie *P. acuta* provenientes de los sitios E3 y E4 del Arroyo Enna mostró que los organismos del sitio E4 presentaron una marcada disminución de la acumulación de RB en relación al sitio E3. Si bien en ambos casos se observó un aumento de la concentración intracelular de RB en presencia de verapamilo, sólo fue significativa para los moluscos provenientes de E4. (Fig. 24A). El valor R obtenido para E4 es levemente menor al de E3 (Fig. 24B).

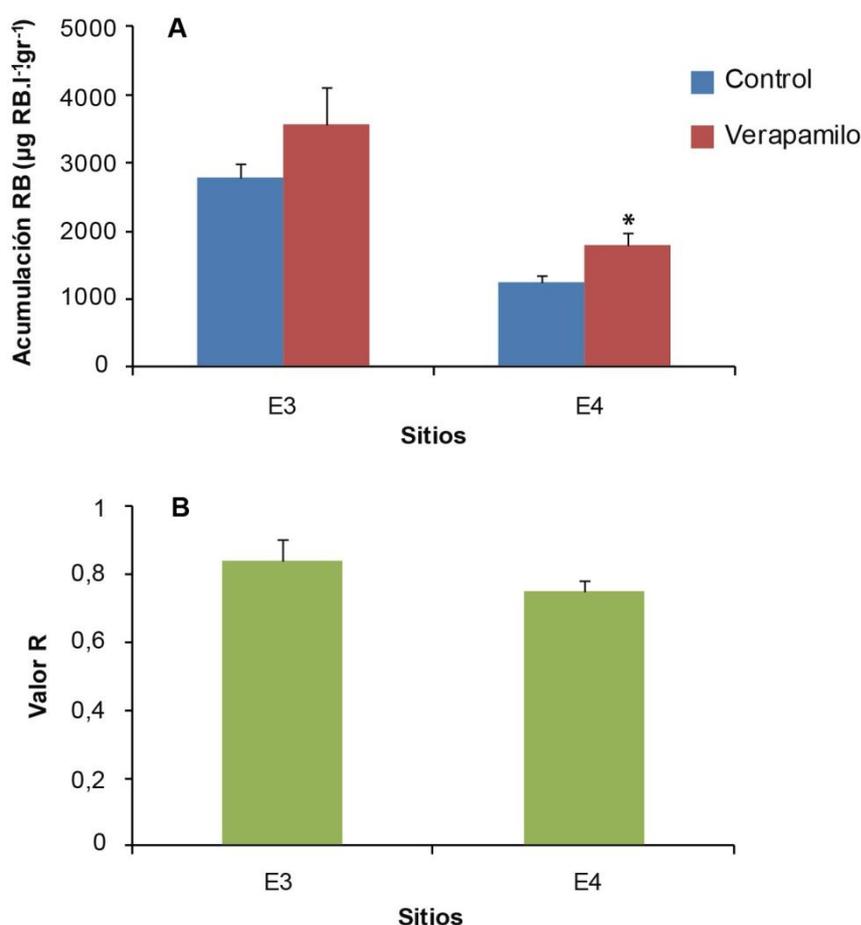


Figura 24. Evaluación de la acumulación de RB (A) y valores R (B) en organismos de la especie *P. acuta* provenientes de sitios sobre el Arroyo Enna (Noroeste de la Provincia de Chubut, Patagonia, Argentina). Se grafican los valores promedios de cada variable y las barras indican el error estándar (E3 n = 7, E4 n = 24). El símbolo (\*) indica una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto del control.

Con respecto a los moluscos provenientes de los sitios I3 e I4 del Arroyo Ingram, pudo apreciarse un patrón similar. Se observó una menor acumulación en condiciones control para el sitio I4, con respecto a I3. Si bien las concentraciones en presencia de verapamilo fueron levemente mayores en relación al control en los organismos provenientes del sitio I3, ésta diferencia no fue significativa ( $p > 0,05$ ) mediante las técnicas utilizadas. Sí pudo observarse un aumento significativo en la acumulación de RB en moluscos *P. acuta* provenientes del sitio I4 cuando fueron incubados en presencia de verapamilo (Fig. 25A). Los valores R para los dos casos fueron similares.

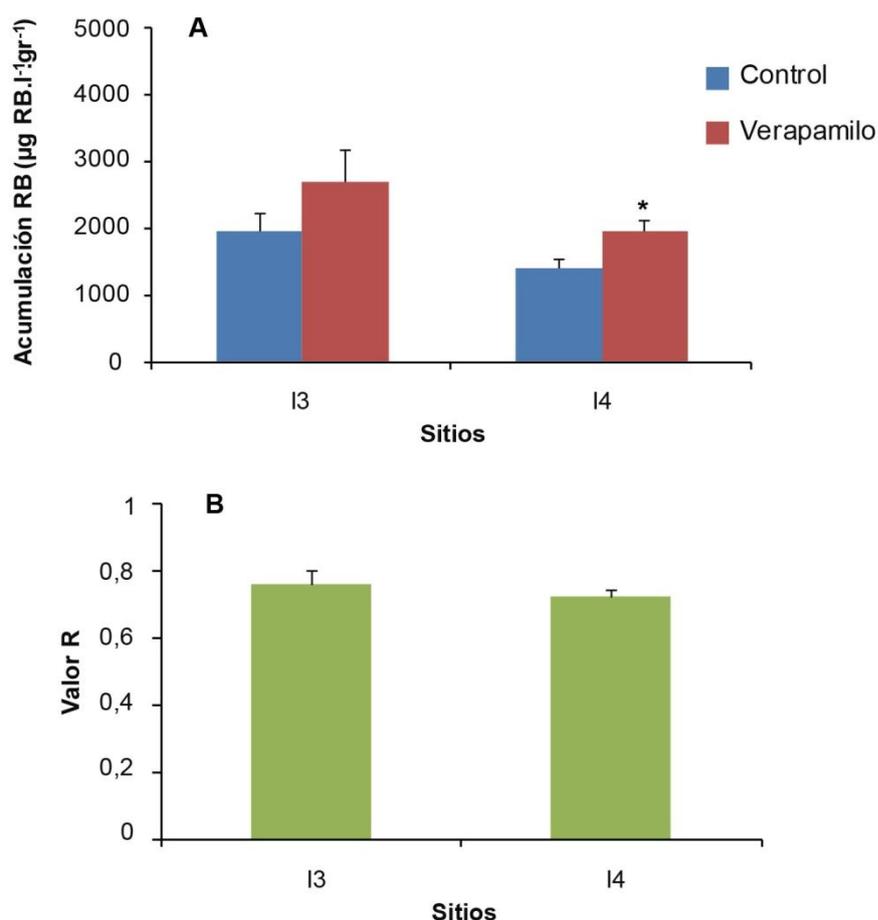


Figura 25. Evaluación de la acumulación de RB (A) y valores R (B) en organismos de la especie *P. acuta* provenientes de sitios sobre el Arroyo Ingram (Noroeste de la Provincia de Chubut, Patagonia, Argentina). Se grafican los valores promedios de cada variable y las barras indican el error estándar (I3 n = 16, I4 n = 23). El símbolo (\*) indica una diferencia significativa ( p < 0.05) con respecto del control.

### ***Actividad MXR de Physa acuta en sitios con distintos tipos de disturbio***

Debido a la presencia de la especie *P. acuta* en sitios afectados por diferentes tipos de prácticas antrópicas y su aparición en los últimos años en algunos sitios de nuestra región que presentan escasa intervención del hombre, se tuvo la posibilidad de analizar la actividad de MXR en organismos presentes en sitios sometidos a diferentes niveles de disturbio. Se comparó dicha actividad en individuos presentes en un sitio localizado en el Arroyo Esquel, aguas debajo de la ciudad, que recibe las descargas de la planta de tratamiento de líquidos cloacales de la ciudad homónima (Postplanta), un

sitio ubicado sobre el mismo arroyo, aguas arriba de la urbanización (Referencia) y en los sitios E4 e I4 de los Arroyos Enna e Ingram respectivamente, que se encuentran afectados por prácticas agropecuarias. Estos ensayos mostraron que los organismos presentes en el sitio de referencia acumularon 4 veces más RB en condiciones control que los presentes en los sitios afectados por prácticas agropecuarias (uso rural), y 7 veces más que los presentes en el sitio afectado por los residuos sólidos urbanos (Fig. 26). Esto indicaría una mayor capacidad de detoxificación en los organismos del sitio afectado por la contaminación urbana, y un nivel de actividad intermedio en los organismos de los sitios afectados por las prácticas agropecuarias, con respecto al sitio de referencia. El valor R calculado como la relación entre la acumulación de RB en ausencia y presencia de verapamilo, indicó que la actividad del sistema MXR debido a la P-gp es ~25 % mayor en el sitio afectado por la urbanización en relación al sitio de referencia y a los afectados por prácticas agropecuarias.

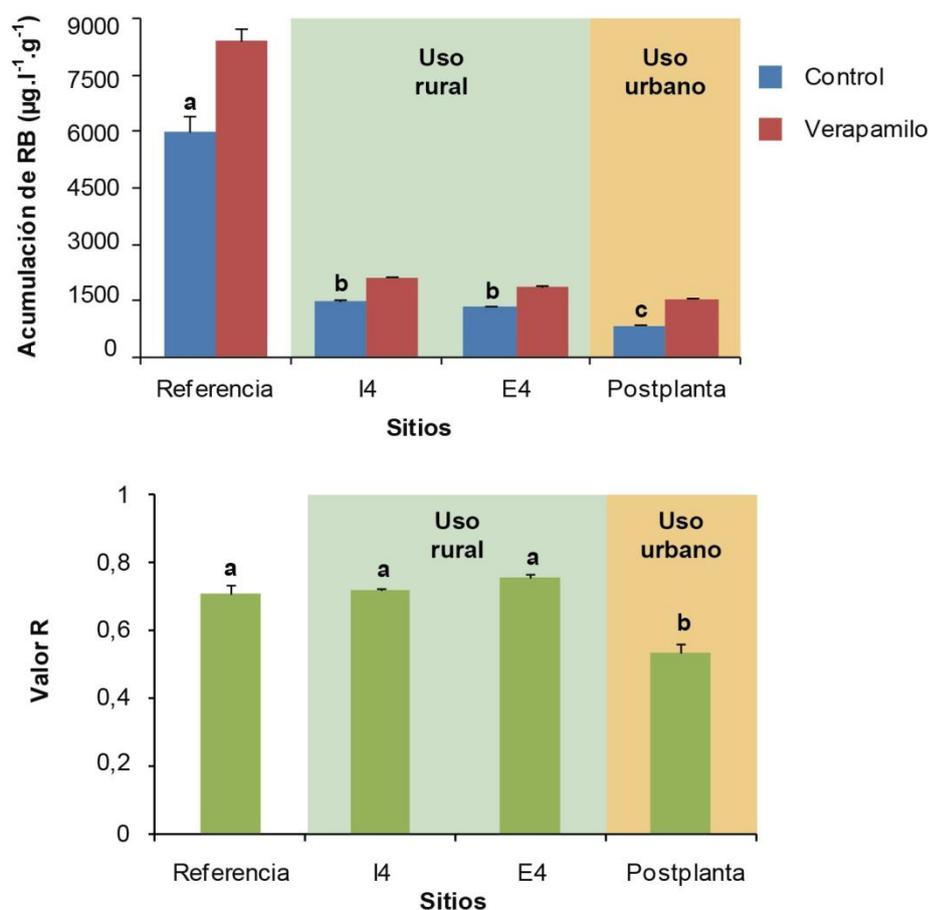


Figura 26. Acumulación de RB en ausencia (control) y presencia del inhibidor (verapamilo) (superior) y valor R calculado para cada sitio (inferior) en moluscos *P. acuta* (Noroeste de la Provincia de Chubut, Patagonia, Argentina). Se grafican los valores promedios de cada variable y las barras indican el error estándar. Las letras indican diferencias significativas para la acumulación de los controles entre los sitios (Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ).

#### 4.5.3 Actividad MXR *in vitro*

Se evaluó la actividad MXR en moluscos dulceacuícolas *Ch. dombeiana* y *P. acuta*, expuestos a diferentes concentraciones de dos de los compuestos más utilizados en las actividades agropecuarias de la región: el herbicida glifosato, y el antiparasitario ivermectina. En el caso del glifosato, se realizaron ensayos utilizando un compuesto comercial y el principio activo de este compuesto. A fin de evaluar el efecto inductor del sistema MXR producido por las drogas antes mencionadas, se realizaron incubaciones por períodos de 96 y 240 h, y se realizaron los ensayos de acumulación de

RB antes descriptos. En una primera instancia se evaluaron los valores de acumulación de RB en condiciones control (ausencia de inhibidor), como indicador de la actividad del mecanismo de detoxificación MXR. Dado que estos datos no presentaron diferencias entre los grupos expuestos a distintas concentraciones de los compuestos analizados, se definió evaluar y mostrar los valores R, que son un indicador de la fracción de este sistema de detoxificación que se debe a la actividad de Pg-P.

### ***Actividad de MXR in vitro de Chilina dombeiana expuestos a glifosato***

Los individuos de *C. dombeiana* expuestos a concentraciones de 100 y 500  $\mu\text{g.l}^{-1}$  de glifosato comercial durante períodos de 96 h mostraron un menor valor R, es decir una mayor actividad de este sistema de detoxificación, en relación a los individuos mantenidos en condiciones control, y la diferencia en relación a estos últimos resultó estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) (Fig. 27). Por su parte, los individuos que permanecieron en presencia de glifosato puro (principio activo) por el mismo periodo de tiempo no mostraron diferencias significativas en relación a los individuos control. Al comparar los organismos expuestos a las diferentes formulaciones, se encontró una diferencia significativa entre ambos grupos en las concentraciones de 100 y 500  $\mu\text{g.l}^{-1}$ .

Los moluscos expuestos durante 240 h a las dos presentaciones de glifosato, en las diferentes concentraciones, no mostraron una actividad del sistema MXR significativamente distinta de los individuos control, ni entre las formulaciones (Fig. 27).

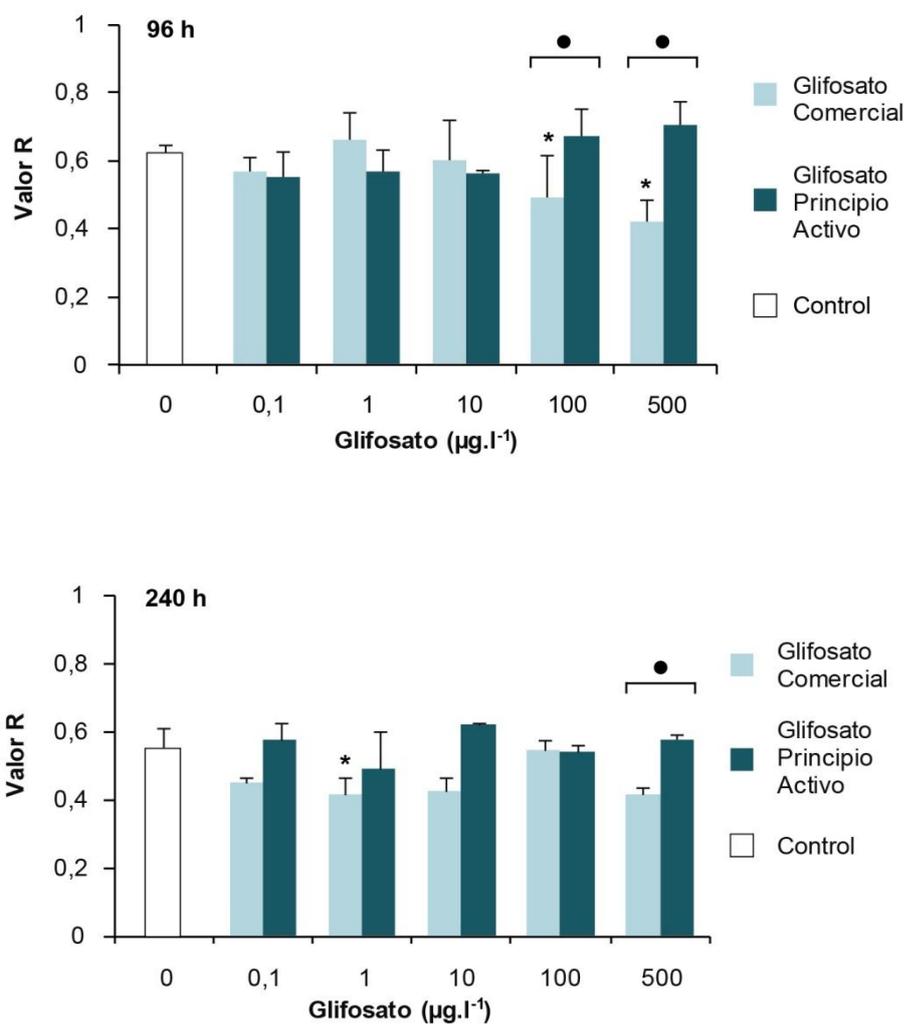


Figura 27. Actividad de MXR en *Chilina dombeiana* en presencia de diferentes concentraciones de glifosato comercial (n = 4) y el principio activo (n = 3) durante períodos de 96 h (superior) y 240 h (inferior). Los (\*) indican diferencias significativas con respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ). Los (●) muestran diferencias significativas entre los grupos indicados.

### Actividad de MXR in vitro de *Chilina dombeiana* expuestos a ivermectina

Los moluscos de la especie *C. dombeiana* que fueron expuestos a concentraciones de  $1 \mu\text{g.l}^{-1}$  de ivermectina comercial durante períodos de 96 h mostraron una mayor actividad de MXR en relación a los individuos mantenidos en condiciones control ( $p < 0.05$ ) (Fig 28). Las restantes concentraciones evaluadas no mostraron diferencias con respecto a este último ( $p > 0.05$ ). Un resultado similar se obtuvo para los moluscos expuestos a las mismas concentraciones por 240 h, aunque en este caso los datos no mostraron diferencias significativas en la actividad de este sistema de detoxificación en relación a los controles (Fig. 28).

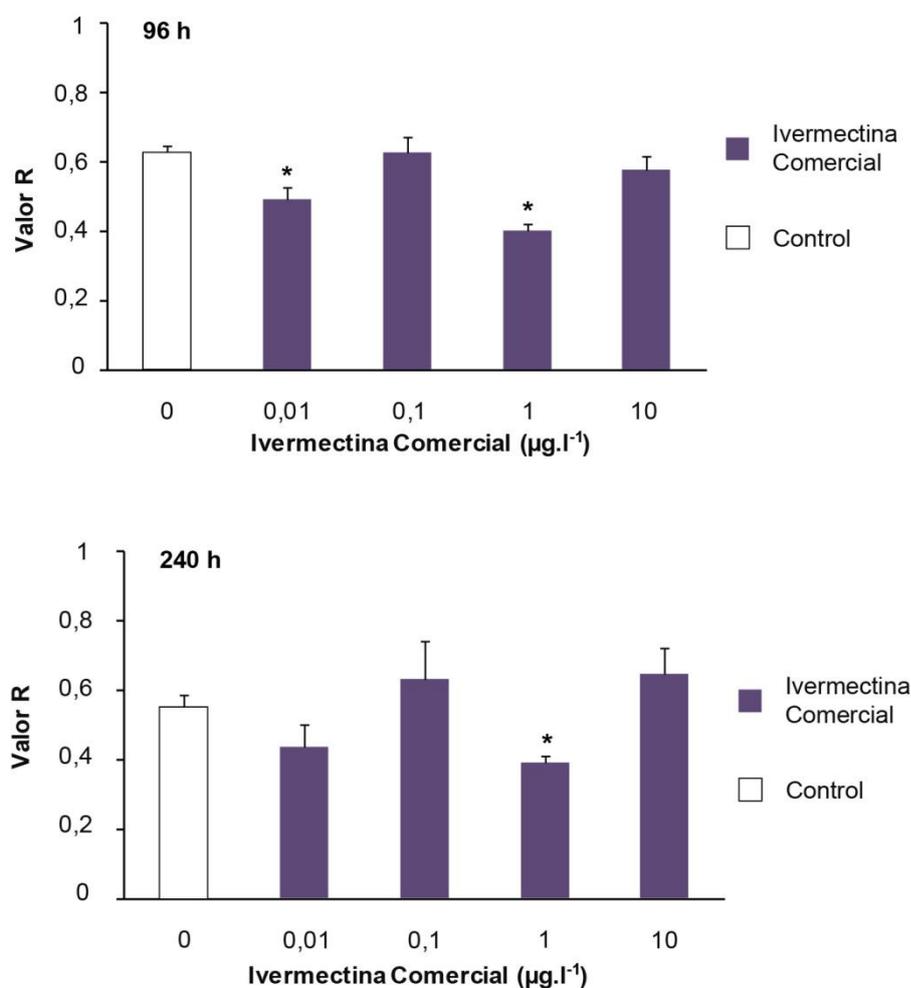


Figura 28. Actividad de MXR en *Chilina dombeiana* en presencia de diferentes concentraciones de ivermectina comercial ( $n = 3$ ) durante períodos de 96 h (superior) y 240 h (inferior). Los (\*) indican diferencias significativas con respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ).

### ***Actividad de MXR in vitro de Physa acuta expuestos a glifosato***

Los moluscos de la especie *P. acuta* expuestos a concentraciones de 10  $\mu\text{g.l}^{-1}$  de glifosato comercial durante períodos de 96 h mostraron una mayor actividad del sistema de detoxificación analizado en relación a los individuos del grupo control ( $p < 0.05$ ) (Fig. 29), no así las restantes concentraciones analizadas. Por su parte, los individuos que permanecieron en presencia del principio activo a concentraciones de 0.1  $\mu\text{g.l}^{-1}$ , 1  $\mu\text{g.l}^{-1}$  y 100  $\mu\text{g.l}^{-1}$  durante el mismo período de tiempo también mostraron diferencias en el nivel de actividad MXR en relación al grupo control ( $p < 0.05$ ) (Fig. 29).

Los moluscos expuestos 240 h a las dos presentaciones de glifosato en sus diferentes concentraciones, no mostraron una actividad del sistema de detoxificación significativamente diferente a los de los individuos del grupo control ( $p > 0.05$ ) (Fig. 29). Sin embargo, se observa la misma tendencia de inducción del sistema MXR (disminución del valor R) para la formulación comercial que la observada a 96 h.

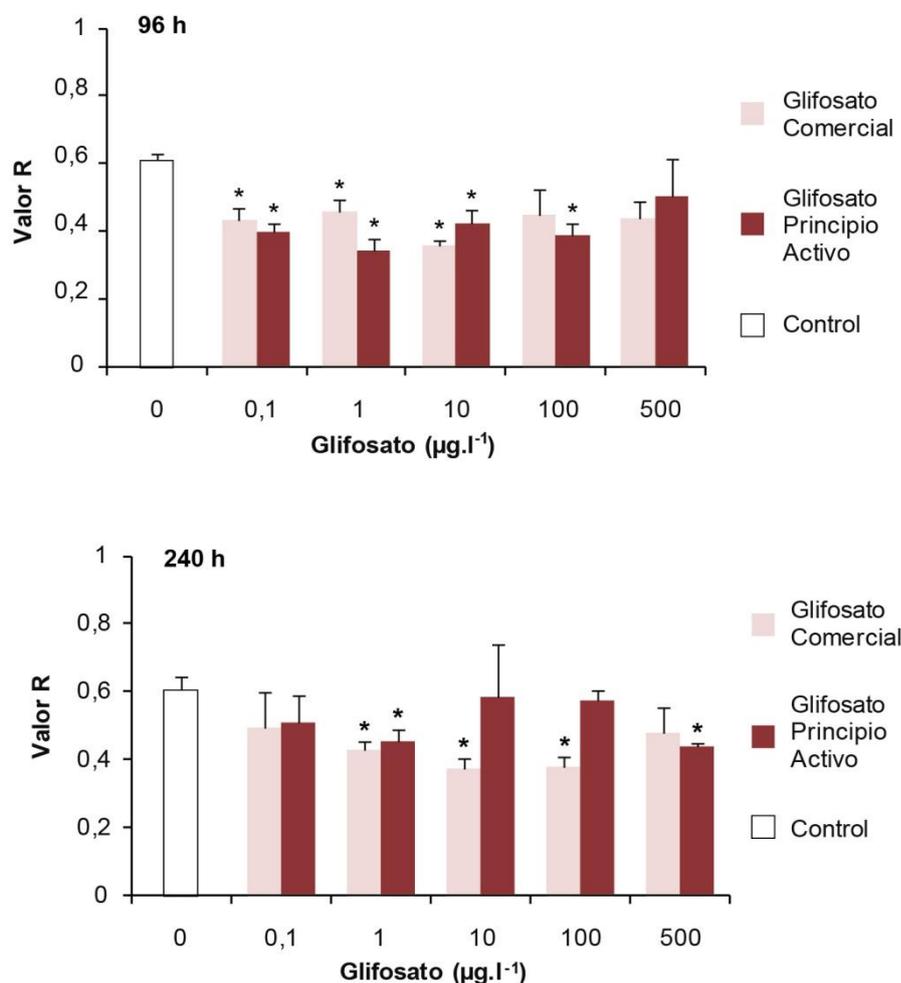


Figura 29. Actividad de MXR en *Physa acuta* en presencia de diferentes concentraciones de glifosato comercial (n = 4) y el principio activo (n = 3) durante períodos de 96 h (superior) y 240 h (inferior). Los (\*) indican diferencias significativas con respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ).

#### ***Actividad de MXR in vitro de Physa acuta expuestos a ivermectina***

Con respecto a los ensayos realizados con individuos de la especie *P. acuta* expuestos a diferentes concentraciones de ivermectina comercial durante períodos de 96 y 240 h, se observaron diferencias significativas con respecto del control, en los individuos expuestos a  $0,1 \mu\text{g.l}^{-1}$  de glifosato durante 96 h. La exposición de organismos de esta especie a este compuesto durante 240 h, mostro diferencias significativas en el valor R de los individuos expuestos a concentraciones de  $0,1$  y  $10 \mu\text{g.l}^{-1}$  (Fig. 30).

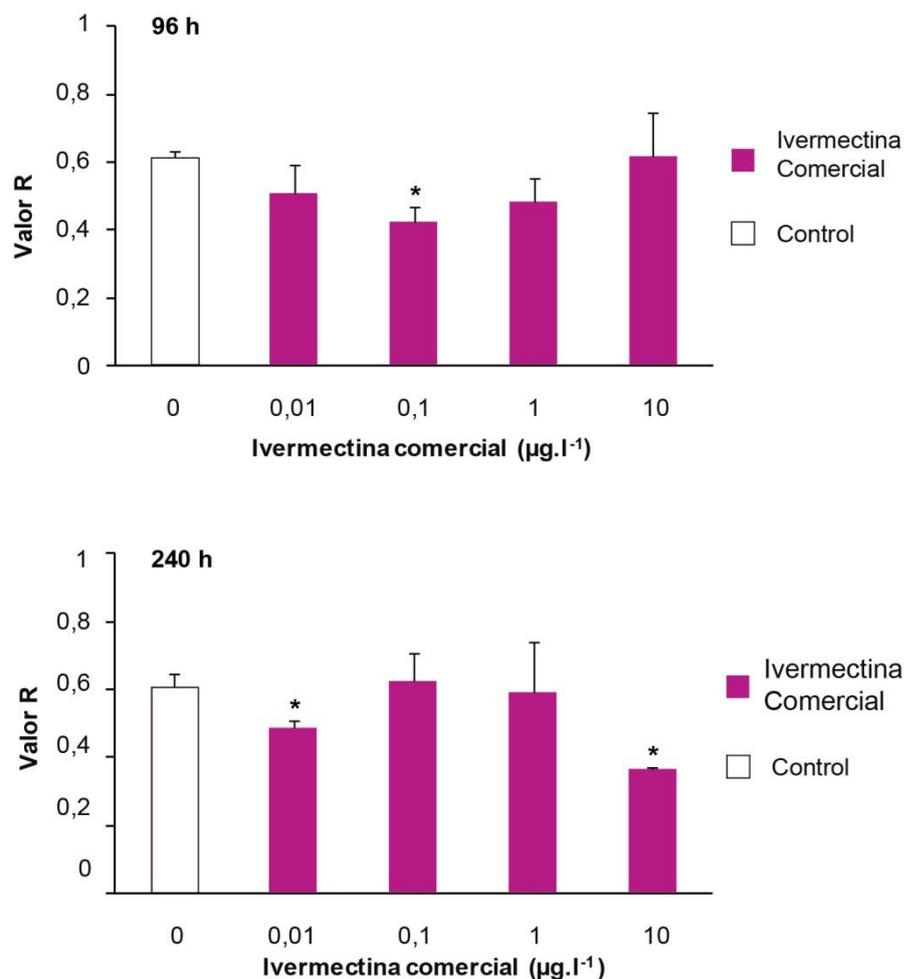


Figura 30. Actividad de MXR en *Physa acuta* en presencia de diferentes concentraciones de ivermectina comercial (n = 3) durante períodos de 96 h (superior) y 240 h (inferior).

## 4.6 Atributos de la comunidad de macroinvertebrados bentónicos

### 4.6.1 Composición taxonómica

Durante el presente estudio se registraron un total de 111 taxones de macroinvertebrados, pertenecientes a los Phyla: Platyhelminthes (1), Nematoda (1), Annelida (18), Mollusca (5) y Arthropoda (86) (Tabla 11).

Tabla 11. Densidad media (ind.m<sup>-2</sup>), densidad total, y riqueza total acumulada de macroinvertebrados por sitio para los Arroyos Ruca, Enna e Ingram (2015), Chubut, Argentina. Se consignan los códigos utilizados en los ordenamientos multivariados y los grupos funcionales (GF) asignados: F: fragmentador, R: raspadores, CF: colectores filtradores, CR: colectores recolectores y P: predadores.

Taxa	GF	Código	Arroyo Ruca			Arroyo Enna		Arroyo Ingram			
			R1	R2	R3	E1	E2	I1	I2	I3	I4
<b>Platyhelminthes</b>											
<i>Girardia</i> sp.	P	<i>Gir</i>	1		6		9			51	157
<b>Nematoda</b>											
Nematoda sp.	P	<i>Nema</i>	4	23	36	28	28			49	40
<b>Annelida</b>											
<b>Hirudinea</b>											
<i>Helobdella</i> sp.	P	<i>Hel</i>									9
<i>Helobdella araucana</i>	P	<i>Hela</i>									2
<i>Helobdella simplex</i>	P	<i>Hels</i>		1	1	1				117	29
<i>Helobdella hyalina</i>	P	<i>Helh</i>			2					17	6
<i>Helobdella lineata</i>	P	<i>Hell</i>		2	2					16	3
<i>Helobdella michaelsoni</i>	P	<i>Helm</i>			8		2			31	4
<i>Helobdella obscura</i>	P	<i>Helo</i>									1
<i>Theromyzon propinquus</i>	P	<i>Tp</i>								2	
<i>Patagoniobdella similis</i>	P	<i>Pats</i>					1			4	4
<b>Oligochaeta</b>											
Phreodrilidae spp.	CR	<i>Phreo</i>			37					94	
<i>Lumbriculus variegatus</i>	CR	<i>Lumv</i>	260	663	1099	317	445	66	463	2126	331
Enchytraeidae sp.	CR	<i>Enc</i>			37						301
<i>Chaetogaster</i> sp.	CR	<i>Chae</i>							6		
Tubificidae spp.	CR	<i>Tub</i>									202
<i>Pristina</i> sp.	CR	<i>Pris</i>		413	202			42			
<i>Nais</i> sp.	CR	<i>Nais</i>			122						
<i>Naididae</i> sp.	CR	<i>Naid</i>			40			2	12		597
<i>Naididae</i> sp1.	CR	<i>Naid1</i>	30								
<b>Mollusca</b>											
<b>Gasteropoda</b>											
<i>Chilina dombeiana</i>	R	<i>Chd</i>	17	39	30	45	62		1	83	34
<i>Hydrobiidae</i> sp.	R	<i>Hyd</i>	1	3		50	3			3	9
<i>Physa acuta</i>	R	<i>Physa</i>							3	18	65
<i>Biomphalaria</i> sp.	R	<i>Biom</i>									1
<b>Bivalvia</b>											
<i>Diplodon chilensis</i>	CF	<i>Dipl</i>	1	3	8	6	3				10
<b>Arthropoda</b>											

### Crustacea

<i>Hyalella curvispina</i>	CR	<i>Hyal</i>	9	15	4	4		22	109	5692	1753
Ostracoda	CF	<i>Ostr</i>							207	1	

### Arachnida

Hydracarina sp.	R	<i>Hydra</i>	1	34	81	7	7		6		
-----------------	---	--------------	---	----	----	---	---	--	---	--	--

### Insecta

#### Plecoptera

<i>Udamocercia arumifera</i>	F	<i>Ua</i>	2				1					
<i>Limnoperla jaffueli</i>	R	<i>Lj</i>	11	29			12	32	213	7	2	19
<i>Aubertoperla illiesi</i>	R	<i>Ai</i>	498	687	905	228	140	262	19	3	6	
<i>Antarctoperla michaelsoni</i>	F	<i>Am</i>					12	6				
<i>Notoperlopsis femina</i>	R	<i>Nf</i>		1	3							
<i>Pelurgoperla personata</i>	CR	<i>Pp</i>	13	2	6	6						
<i>Potamoperla myrmidon</i>	R	<i>Pmyr</i>		6								

#### Ephemeroptera

<i>Meridialaris diguillina</i>	R	<i>Mdig</i>		13				2	1	1	5	8
<i>Meridialaris laminata</i>	R	<i>Mlam</i>	65	29	38						1	521
<i>Meridialaris chiloeensis</i>	R	<i>Mchi</i>	59	83	168	18	81	3			14	
<i>Penaphlebia chilensis</i>	CR	<i>Pchi</i>	14	6	27		29				33	19
<i>Nousia delicata</i>	CR	<i>Noud</i>		2			92	18		10	29	3
<i>Nousia bella</i>	CR	<i>Noub</i>	37	13	10	21	6					
<i>Nousia minor</i>	CR	<i>Noum</i>	113	56		133						1
<i>Metamonius anceps</i>	R	<i>Met</i>					1					
<i>Andesiops torrens</i>	R	<i>Atorr</i>	1	20	1		2				1	1
<i>Andesiops ardua</i>	R	<i>Aard</i>	94	29	17	98	105			4	6	72

#### Trichoptera

<i>Hudsonema flaminii</i>	F	<i>Hud</i>	3	35	8	5	51				5	6
<i>Brachysetodes</i> sp.	F	<i>Brac</i>	19	44	29	72	182			1		1
<i>Parasericostoma ovale</i>	F	<i>Pova</i>	2	11	104		6				155	1195
<i>Vergers</i> sp1	F	<i>Ver1</i>			20				142	5	70	17
<i>Vergers</i> sp2	F	<i>Ver2</i>							33			
<i>Monocosmoecus</i> sp.	F	<i>Mon</i>		1		1						
<i>Rheochorema</i> sp.	P	<i>Rheo</i>	1	4								
<i>Rheochorema tenuispinum</i>	P	<i>Rheot</i>	1	1								
<i>Rheochorema lobuliferum</i>	P	<i>Rheol</i>	3	8	10							
<i>Neopsilochorema tricarinarum</i>	P	<i>Netri</i>		1								
<i>Neonatopsyche unispina</i>	P	<i>Neuni</i>	13	28	8	15	17			5	53	10
<i>Neonatopsyche brevispina</i>	P	<i>Nebre</i>	2	1							31	
<i>Schajovskoya neuquenensis</i>	P	<i>Scha</i>	1	9								
<i>Cailloma pumida</i>	P	<i>Cai</i>	4	12	3					1		
<i>Polycentropus</i> sp.	P	<i>Poly</i>					28					
<i>Metrichia neotropicalis</i>	R	<i>Mene</i>							1			

<i>Oxyethira bidentata</i>	CR	<i>Oxy</i>			3	1			4	2	8
<i>Austrotinodes</i> sp.	P	<i>Aus</i>				15					
<i>Smicridea annulicornis</i>	CF	<i>Smi</i>	6	15	20					1	6
<b>Coleoptera</b>											
<i>Scirtidae</i> spp.	CF	<i>Scir</i>							1		
<i>Austrolimnius nicteleoides</i>	R	<i>Anic</i>	28	52	28	34	182			2	
<i>Austrolimneus elatus</i>	R	<i>Aela</i>		2							
<i>Neoelmis argentinensis</i>	R	<i>Neo</i>		1							
<i>Luchoelmis cekalovici</i>	R	<i>Lucho</i>		1							
<i>Lancetes</i> sp.	P	<i>Lanc</i>							3	16	1
<b>Diptera</b>											
<i>Dasyoma</i> sp.	P	<i>Da</i>	2	5	2	7	29				
<i>Dixidae</i> spp	CF	<i>Di</i>	2				42			1	
<i>Tipula</i> sp.	F	<i>Tip</i>		1			2				
<i>Hexatoma</i> sp.	P	<i>Hex</i>			1						
<i>Molophilus</i> sp.	F	<i>Mol</i>	1	1	2						
<i>Gigantodax</i> sp.	CF	<i>Gig</i>	3057	274	52	1788	324	389	800	169	167
<i>Tabanidae</i> spp.	P	<i>Tab</i>		1							
<i>Empididae</i> sp.	P	<i>Emp</i>		2							
<i>Empididae</i> sp1	P	<i>Emp1</i>	3	7	3	1	2	4		1	19
<i>Ceratopogonidae</i> sp1	P	<i>Cer1</i>	6	127	31	3	9			1	
<i>Ceratopogonidae</i> sp2	P	<i>Cer2</i>		1							
<i>Thaumaleidae</i> spp.	P	<i>Thau</i>					1	1	22	1	5
<i>Cryptochironomus</i> sp.	CR	<i>Cryp</i>			15						178
<i>Diamesini</i> sp.	CR	<i>Diam</i>		65	6	3	1	4	2		121
<i>Heptagyni</i> sp.	CR	<i>Hep</i>	5	6	6			30	35	22	67
<i>Lopescladius</i> sp.	CR	<i>Lope</i>	5	49	8	11	87		56	22	
<i>Eukiefferiella</i> sp.	CR	<i>Euk</i>	5			5	115				
<i>Orthocladius</i> sp.	CR	<i>Orth</i>	2	6						33	185
<i>Orthocladius</i> sp1	CR	<i>O1</i>							72		
<i>Orthocladius</i> sp2	CR	<i>O2</i>	62	2901	6	81	715	192	1933	1287	6665
<i>Parametriocnemus</i> sp.	CR	<i>Para</i>		5	1007		30	539	1423		1892
<i>Parapsectrocladius</i> sp.	CR	<i>Parap</i>	317	2888	1010	30	448			153	
<i>Thienemanniella</i> sp.	CR	<i>Thien</i>	104	108	6	6		1	1	11	76
<i>Parochlus</i> sp.	CR	<i>Paro</i>	30	88	27	2	50	4			
<i>Podonomus</i> sp.	CR	<i>Podo</i>	2					2	1		
<i>Parachironomus</i> sp.	CR	<i>Parach</i>									190
<i>Polypedilum</i> sp.	CR	<i>Polyp</i>			19		2			42	6
<i>Pseudosmittia</i> sp.	CR	<i>Pseu</i>		1						418	
<i>Pseudochironomus</i> sp.	CR	<i>Pseude</i>			33						155
<i>Rheotanytarsus</i> sp.	CR	<i>Rheo</i>	25	42	14	716	356		74	75	284
<i>Tanytarsus</i> sp.	CR	<i>Tany</i>		12			37			3	216

Tanypodinae sp.	P	<i>Tany2</i>	8	1	3	19	5	22	6	3	
Tanypodinae sp1	P	<i>Tany3</i>	2		7				115	22	346
Tanypodinae sp2	P	<i>Tany4</i>	5	66	54	363	813		2	40	246
Sciomyzidae sp.	P	<i>Scio</i>						159	9		
Muscidae spp.	P	<i>Mus</i>		1						1	
Ephydriidae spp.	R	<i>Eph</i>									2
<b>Odonata</b>											
<i>Aeshna</i> sp.	P	<i>Ae</i>							1		1
<i>Cyanallagma interruptum</i> sp.	P	<i>Coe</i>									2
<b>Hemiptera</b>											
<i>Sigara</i> sp.	P	<i>Sig</i>				1				50	1
<b>Megaloptera</b>											
<i>Ilyobius chilensis</i>	P	<i>Ily</i>	6	3	3	1		13			
<b>Densidad media (ind.m<sup>-2</sup>)</b>			<b>4963</b>	<b>9053</b>	<b>4448</b>	<b>4334</b>	<b>4443</b>	<b>2149</b>	<b>5435</b>	<b>9156</b>	<b>16275</b>
<b>Riqueza total</b>			<b>52</b>	<b>67</b>	<b>57</b>	<b>47</b>	<b>41</b>	<b>24</b>	<b>37</b>	<b>51</b>	<b>57</b>

Los Diptera presentaron la mayor riqueza de taxonómica con un total de 37 taxones, seguidos por los Trichoptera con 19 y los Ephemeroptera con 10 taxones. Dentro de los primeros, la familia mejor representada fue Chironomidae (23 taxones), para los Trichoptera la familia Hydrobiosidae (8 taxones) y para los Ephemeroptera la familia Leptophlebiidae (7 taxones).

Los sitios que presentaron una menor riqueza taxonómica fueron I1 e I2, con 24 y 37 taxones respectivamente. Los sitios que presentaron una mayor riqueza fueron R2, R3 e I4 con 67 el primero y 57 taxones los segundos. (Tabla 11). Al analizar la riqueza promedio de taxones por sitio en el arroyo Ruca se puede apreciar que esta aumenta desde el sitio R1 y hacia los sitios R2 y R3 (Fig. 31). En el arroyo Enna disminuye del sitio E1 al sitio E2. Finalmente en el arroyo Ingram se apreció un incremento de esta variable desde I1 a I4.

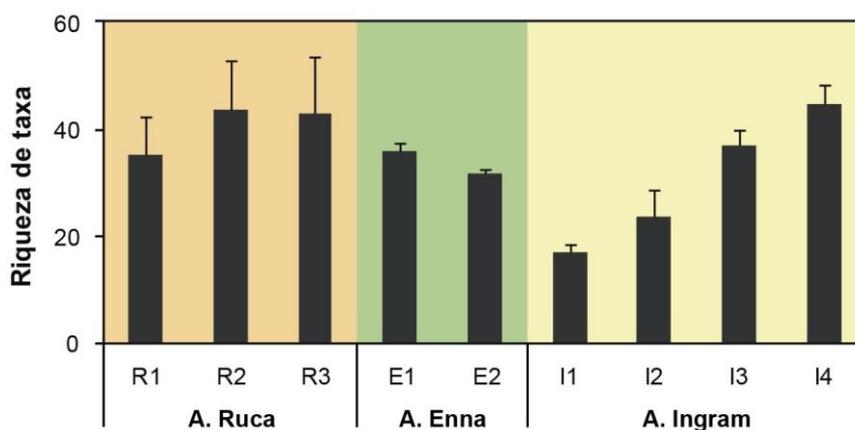


Figura 31. Riqueza taxonómica promedio por sitio de estudio para los Arroyos Ruca, Enna e Ingram (n=2) (Noroeste de la Provincia de Chubut, Patagonia, Argentina). Las barras representan el desvío estándar.

#### 4.6.2 Densidad de macroinvertebrados

La densidad media de macroinvertebrados bentónicos, evaluada en los 9 sitios mencionados, estuvo comprendida entre 2149 ind.m<sup>-2</sup> (I1) y 16275 ind.m<sup>-2</sup> (I4) (Tabla 11). Analizando la densidad media obtenida de los sitios de muestreo en los distintos períodos hidrológicos evaluados, se pudo observar que en todos los sitios la densidad media aumentó en el período de aguas bajas, correspondiente con los meses de octubre-Noviembre 2015 (Fig. 32).

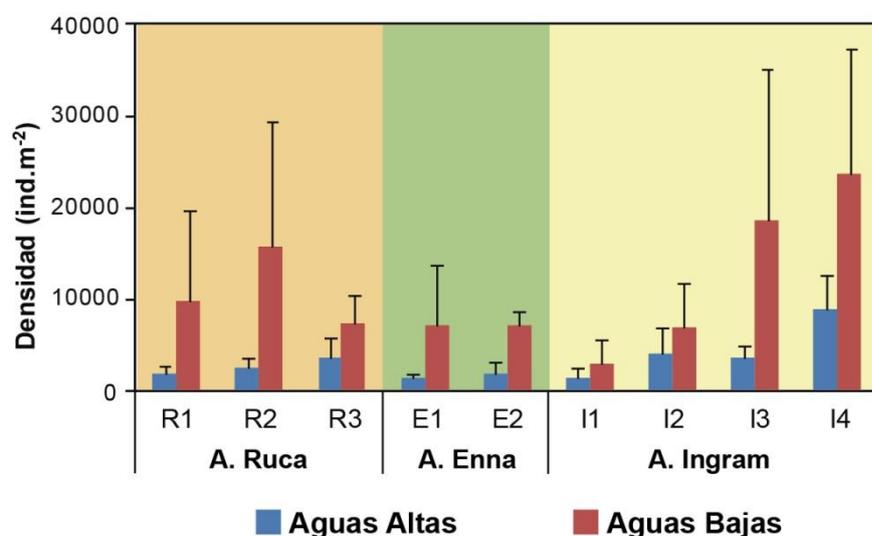


Figura 32. Valores medios y desvíos estándar (n = 6) por sitio de la densidad de macroinvertebrados bentónicos. Aguas altas (Agosto 2015), Aguas bajas (Octubre-Noviembre 2015) (Noroeste de la Provincia de Chubut, Patagonia, Argentina).

Los dípteros, representados en todos los sitios en ambos momentos de muestreo, mostraron una densidad media que superó el 60 % del total de ind.m<sup>-2</sup> en los sitios R1, R2, E1, E2, I1, I2 e I4, con densidades medias que variaron entre 1347 ind.m<sup>-2</sup> (I1) y 10818 ind.m<sup>-2</sup> (I4). Para todos los casos, excepto en los sitios R1 y E1, la familia Chironomidae representó más del 80% del total de dípteros presentes en los distintos sitios. Al analizar la variación de éste grupo entre los períodos de aguas altas y aguas bajas (Fig. 33) puede apreciarse que su densidad aumentó en los períodos de aguas bajas, sugiriendo un desmejoramiento de las condiciones ecológicas.

Los Annelida por su parte, estuvieron representados en todos los sitios, contribuyendo con entre un 5% (R1, I1) y un 28% (R3) de la abundancia relativa de individuos en los sitios. Entre los Annelida, la especie que apareció con mayor frecuencia fue *Lumbriculus variegatus* representando el 70 % y el 88 % de Annelida en los sitios R3 e I3, respectivamente. Puede observarse también que en el arroyo Ruca, la densidad media de este grupo se incrementó de R1 a R3, probablemente en respuesta al empobrecimiento de la calidad del agua. Excepto en el sitio I1, este grupo disminuyó su contribución relativa en abundancia en los períodos de aguas bajas (Fig. 33).

Los Crustacea estuvieron representados en todos los arroyos en bajas densidades, excepto en el arroyo Ingram, en el cual llegó a conformar el 50% de la comunidad de

macroinvertebrados (I3) (Tabla 11). En este arroyo, se observó un aumento de este grupo en el período de aguas bajas en la mayoría de los sitios (Fig. 33), probablemente en respuesta un incremento de la cobertura de macrófitas (mayormente *Myriophyllum quitense*), que monopolizó el sitio durante la época de primavera y verano.

Si bien los plecópteros se registraron en todos los sitios, las mayores densidades medias se observaron en los sitios I1, R3 y R1 donde alcanzaron 22, 16 y 10 % de la densidad media de cada sitio, respectivamente. Cabe destacar que se observaron disminuciones importantes de este grupo en todos los sitios de los arroyos Ruca y Enna en el período de aguas bajas hasta prácticamente desaparecer de estos sistemas. En cuanto al arroyo Ingram este grupo sólo estuvo representado en el sitio I1 e I2, y en ambos casos, su densidad fue mayor en el período de aguas altas que en el de aguas bajas (Fig. 33).

Analizando los porcentajes correspondientes a la abundancia del grupo EPT, se puede apreciar una disminución del mismo en los sitios E1 (54%) al E2 (32%) en el período de aguas altas. Este patrón fue aún más marcado en el arroyo Ingram, el cual mostró una fuerte reducción en el porcentaje de EPT de I1 a I2 (53% a 1.5%, respectivamente).

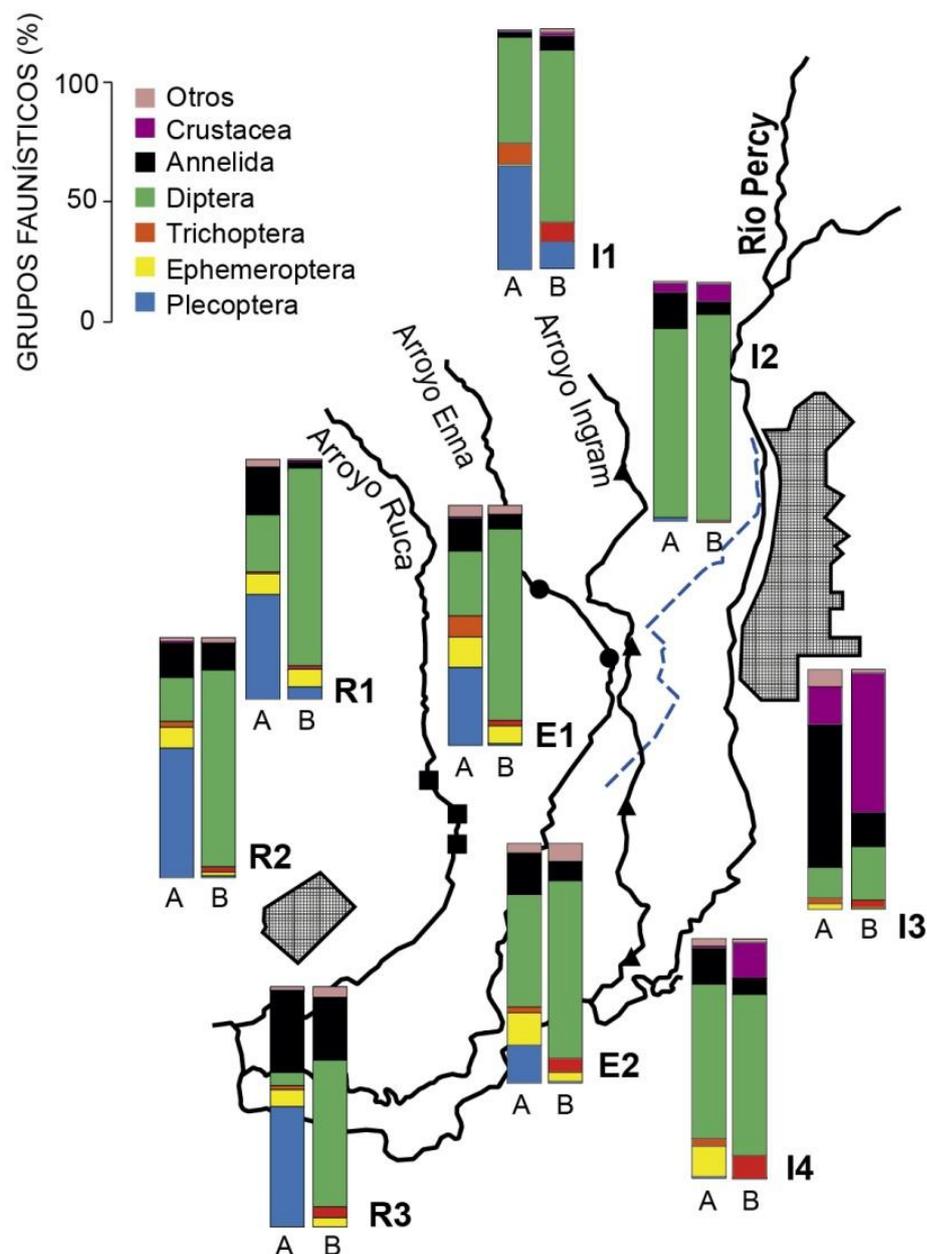


Figura 33. Contribución relativa (porcentajes) de los principales grupos faunísticos de macroinvertebrados bentónicos en los sitios estudiados durante los períodos de aguas altas (A: Agosto 2015) y bajas (B: Octubre-Noviembre 2015) (NO de la Provincia de Chubut, Patagonia, Argentina).

#### 4.6.3 Estructura trófica por sitio

La estructura trófica a partir de la asignación de grupos funcionales a los 111 taxones de macroinvertebrados bentónicos, mostró que el grupo predadores (41 taxones), el grupo colectores-recolectores (28 taxones) y el grupo raspadores (25 taxones) fueron los mejor representados. Le siguieron los fragmentadores (11 taxones) y colectores-filtradores (6 taxones). En términos de abundancia relativa, el grupo de colectores-recolectores representó el 68 % de la densidad total de individuos analizada, seguido por el grupo colector-filtrador que contribuyó con 12 %. La abundancia relativa del primer grupo varió entre el período de aguas altas (55 %) y el período de aguas bajas (73 %), no así la del segundo grupo que permaneció relativamente constante con bajos valores (9 a 13 %).

La elevada abundancia de colectores recolectores se atribuyó fundamentalmente a la presencia de quironómidos *Parametriocnemus sp.* y *Orthocladius sp2.*, oligoquetos *Lumbriculus variegatus* y anfipodos *Hyaella curvispina*. Estos cuatro taxones representaron más del 50% de la abundancia total de este grupo funcional.

Al analizar la abundancia relativa de los distintos grupos funcionales alimentarios, se pudo observar un notable incremento del grupo colector recolector en todos los sitios, con excepción de los sitios R1 y E1, y una disminución de los organismos fragmentadores, al comparar los períodos de aguas altas y bajas. Esta diferencia se acentuó en los sitios que evidenciaban un empobrecimiento de la vegetación de ribera (Fig.34). Asimismo, pudo apreciarse una reducción en el porcentaje de organismos raspadores entre el período de aguas altas y el de aguas bajas, en los sitios que registraron mayores índices de sedimentación y erosión. Los grupos colectores-filtradores, presentes en los sitios R1, E1, I1 e I2, disminuyeron también su representatividad en los sitios aguas abajo en estos arroyos, en ambos períodos hidrológicos.

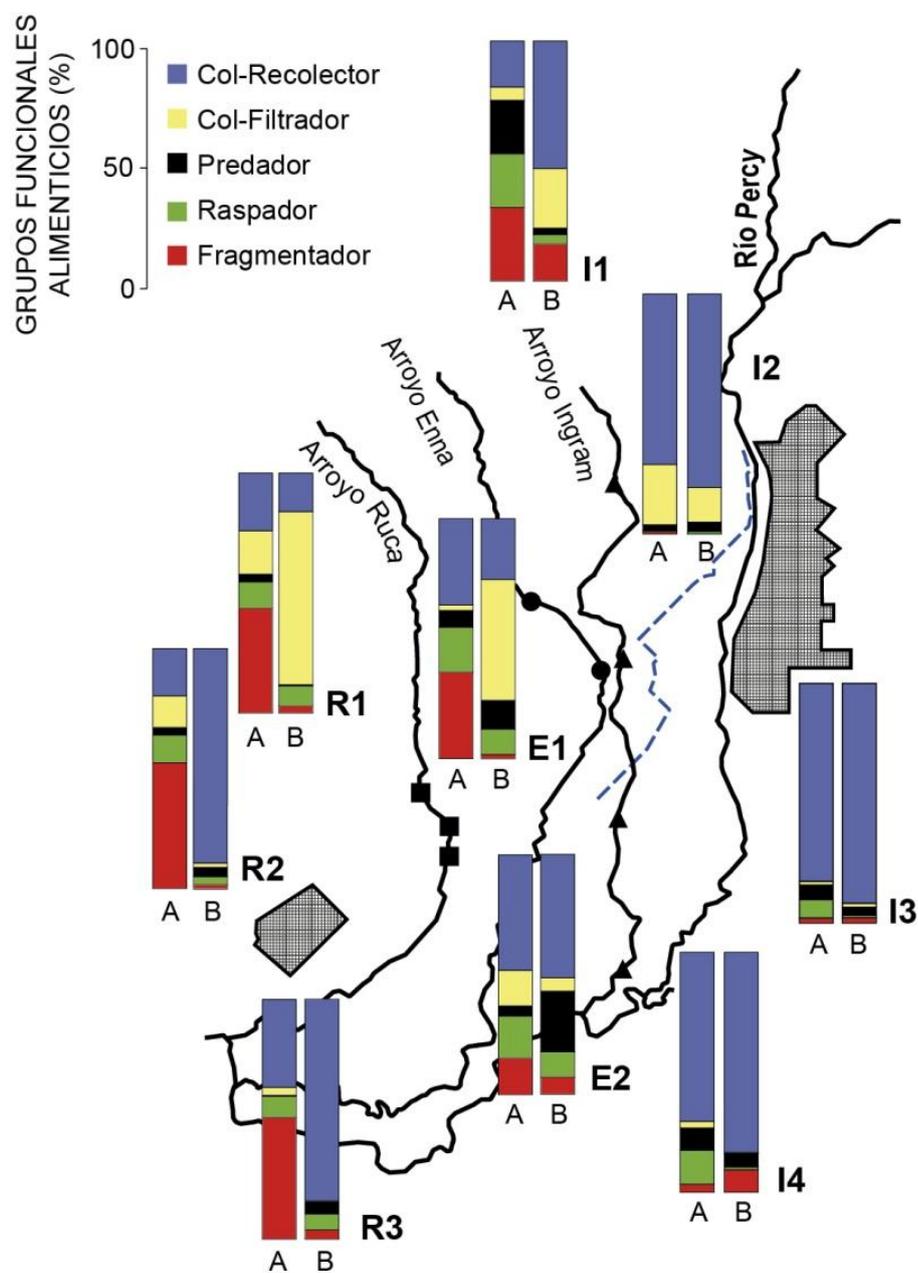


Figura 34. Contribución relativa (porcentajes) de los principales grupos funcionales alimentarios de macroinvertebrados bentónicos en los sitios estudiados durante los períodos de aguas altas (A: Agosto 2015) y bajas (B: Octubre-Noviembre 2015) (Noroeste de la Provincia de Chubut, Patagonia, Argentina).

#### **4.6.4 Análisis de métricas: macroinvertebrados y respuesta al uso de la tierra.**

Se calcularon y evaluaron 34 descriptores de la comunidad de macroinvertebrados para cada sitio y momento de muestreo. Los métricos empleados estuvieron basados en riqueza y abundancia (15 métricos), tolerancia (4 métricos), composición (3 métricos) y atributos funcionales (10 métricos), y se incluyeron también el índice BMPS y el IAP (ver metodología Tabla 3).

De los métricos de riqueza y abundancia evaluados, 10 de ellos mostraron la respuesta esperada al disturbio, mientras que uno de ellos, la riqueza de Coleoptera fue excluida del análisis por presentar una gran cantidad de ceros en la matriz (Tabla 12). En lo que respecta a los métricos de tolerancia 3 de ellos aumentaron, según la respuesta esperada, mientras que uno de ellos, la diversidad de Shannon no mostró un patrón consistente. Entre los métricos de composición, el % EPT disminuyó y el % Chironomidae aumentó de acuerdo a lo predicho, mientras que la relación % EPT/Chironomidae fue excluida del análisis por presentar un rango muy estrecho de variabilidad entre sitios.

De los métricos de grupos funcionales alimentarios evaluados, 7 de ellos exhibieron la respuesta esperada, mientras que uno de ellos, la riqueza de colectores filtradores fue eliminada por no presentar prácticamente variación debido a una baja representación (2-4). El índice biótico IAP, fue descartado dado que no permitió discriminar diferentes condiciones ambientales entre sitios variando los valores entre 9 y 10. Por otra parte el índice BMPS no siguió la respuesta esperada al disturbio, no se pudo apreciar una disminución del índice al aumentar el nivel de disturbio.

Tabla 12. Clasificación y respuesta esperada al disturbio de las métricas de macroinvertebrados bentónicos evaluadas en el estudio. Se indican el Rango, el promedio y la desviación estándar. El símbolo (\*) indica que la respuesta del métrico se correspondió con la respuesta esperada. El símbolo (-) indica que la métrica fue excluida por una pobre representatividad en el pool de sitios, bajo rango de variación, o por la presencia de gran proporción de ceros en la matriz.

Métrica	Rango	Promedio (DE)	Respuesta esperada
<i>Riqueza y abundancia</i>			
Riqueza total	16-50	33.8 (9.1)	Disminuye*
Riqueza de Plecoptera	0-5	2.3(1.2)	Disminuye *
Riqueza de Ephemeroptera	0-6	4.3 (1.7)	Disminuye *
Riqueza de Trichoptera	1-11	4.9 (2.5)	Disminuye *
Riqueza de Coleoptera	0-3	1.0 (0.8)	-
Riqueza de Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera (EPT)	4-21	11.6 (4.3)	Disminuye *
Riqueza de Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera, Coleoptera (EPTC)	5-24	12.6 (4.8)	Disminuye *
Nº familias de insectos	6-18	12.6 (3.0)	Disminuye *
Riqueza de Chironomidae	6-12	8.6 (1.8)	Disminuye
Riqueza de Orthocladiinae	2-6	3.8 (1.1)	Disminuye
EPT/Riqueza de Chironomidae	0.6-2	1.3 (0.4)	Disminuye *
Densidad Total	1430-23747	7015 (6299)	Aumenta*
Densidad de Plecoptera	0-1814	347 (513)	Disminuye *
Densidad de Ephemeroptera	0-1160	248 (284)	Disminuye
Densidad de Trichoptera	13-2201	286 (504)	Disminuye
<i>Tolerancia</i>			
Diversidad de Shannon	1.3-2.5	1.9 (0.3)	Disminuye
Densidad de Annelida	33-2634	907 (806)	Aumenta*
Densidad de Oligochaeta	33-2381	878 (757)	Aumenta*
% taxa tolerantes	451-17543	4280 (4798)	Aumenta*
<i>Composición</i>			
% EPT	0.7-65	23.2 (22.7)	Disminuye *
% Chironomidae	2-79	37.3 (26.7)	Aumenta*
% EPT/Chironomidae	0-27.6	3.4 (7.2)	-
<i>Grupos funcionales alimenticios</i>			
Riqueza de fragmentadores	2-6	3.7 (1.3)	Disminuye *
Riqueza de raspadores	1-14	8.8 (3.2)	Variable*
Riqueza de Predadores	4-16	9.6 (4.0)	Variable*
Riqueza de Colectores-Filtradores	2-4	2.6 (0.6)	-
Riqueza de Colectores-Recolectores	5-14	9.4 (2.6)	Aumenta*
% Fragmentadores	4-2172	556 (613)	Disminuye *
% raspadores	18-1268	397 (308)	Variable*
% Predadores	20-1828	434 (509)	Variable
% Colectores-Filtradores	35-5812	818 (1499)	Variable
% Colectores-Recolectores	276-19800	4816 (5967)	Aumenta*
<i>Índices bióticos</i>			

Monitoreo Biótico de Arroyos Patagónicos (BMPS)	43-139	100.7 (25.3)	Disminuye
Índice Andino Patagónico (IAP)	9-10	9.8 (0.3)	-

De las métricas de riqueza y abundancia expuestas en la Tabla 12, se puede apreciar que la riqueza total disminuyó en particular en el período de aguas bajas desde el sitio R1 al R3, y desde el sitio E1 al sitio E2. En cuanto a la riqueza de Plecoptera el patrón se repitió en los tres sistemas también en el período de aguas bajas. Con respecto a la densidad total, ésta aumentó en el período de aguas altas en los arroyos Ruca y Enna, y lo mismo ocurrió pero en ambos periodos hidrológicos en el arroyo Ingram.

La métrica de composición % EPT mostró una disminución de sus valores a lo largo de cada curso de agua estudiado, en el período de aguas bajas. Además este índice también disminuyó en todos los sitios al compararlo entre los dos períodos hidrológicos, siendo menor durante aguas bajas. Algo similar ocurrió con el métrico % de fragmentadores, que presenta una disminución intra sitio entre los dos períodos hidrológicos.

La métrica de tolerancia densidad de Annelida, por su parte, aumentó en todos los cursos de agua desde los sitios de referencia ubicados en las cabeceras, hacia los sitios más afectados por prácticas agropecuarias, aguas abajo en ambos períodos hidrológicos. Esto no ocurrió con el índice de diversidad de Shannon ( $H'$ )(Tabla 13). Esta métrica no mostró patrones consistentes de acuerdo a lo esperado en los tres arroyos tanto en el período de aguas altas como en el de aguas bajas. Por otra parte se observaron valores muy bajos del índice BMPS en los sitios I1 e I2 lo que podría deberse a que estos sitios se secan y permanecen desconectados del cauce durante varios meses.

Tabla 13. Variación de métricas seleccionadas en los sitios de estudio en los dos períodos hidrológicos analizados: aguas altas (A: Agosto 2015) y bajas (B: Octubre-Noviembre 2015) (Noroeste de la Provincia de Chubut, Patagonia, Argentina)

		Riqueza y abundancia			Composición	Tolerancia		Trófico	Índice
		Riqueza total	Riqueza de Plecoptera	Densidad Total (ind.m <sup>-2</sup> )	% EPT	Densidad de Annelida (ind.m <sup>-2</sup> )	H'	% Fragmentadores	BMPS
R1	A	31	2	1813,00	53,27	366,30	1,85	43,88	99
	B	40	4	8101,15	11,81	212,75	1,34	3,13	105
R2	A	37	3	2504,90	64,92	368,15	1,85	52,51	108
	B	50	4	15602,90	4,26	1788,95	1,81	1,58	121
R3	A	36	2	3635,25	58,93	1243,20	1,76	50,95	108
	B	36	1	7233,50	8,52	1855,55	2,09	3,91	111
E1	A	37	3	1439,30	53,73	201,65	2,50	36,11	139
	B	33	5	7222,40	10,27	434,75	1,81	1,69	126
E2	A	31	3	1825,95	32,02	325,60	2,38	15,41	108
	B	32	3	7054,05	10,91	569,80	2,49	6,92	97
I1	A	16	2	1430,05	52,91	33,30	1,84	30,54	46
	B	18	2	2863,80	19,19	185,00	1,96	15,25	43
I2	A	21	2	4060,75	1,59	614,20	1,42	1,14	68
	B	27	1	6808,00	0,71	349,65	1,76	0,05	90
I3	A	35	1	3668,55	4,79	2177,45	1,69	2,17	106
	B	39	2	18463,00	3,49	2634,40	1,61	2,09	112
I4	A	42	2	8793,05	16,96	1285,75	2,41	3,16	106
	B	47	0	23746,60	9,65	1687,20	1,79	9,14	119

## 4.7 Influencia de las condiciones ambientales sobre la comunidad de macroinvertebrados

### 4.7.1 Análisis de Correspondencias Canónicas

El análisis de Correspondencias Canónicas (ACC) basado en los datos de abundancia de macroinvertebrados (111 taxones) presentes en los 9 sitios de muestreo con diferentes niveles de disturbio se presentan en la figura 35A y los resultados (primeros dos ejes) se resumen en la tabla 14. Las correlaciones especies-ambiente fueron: 0,99 y 0,94 para el primer y segundo eje respectivamente, indicando una fuerte relación entre las variables ambientales seleccionadas. El test de Monte Carlo fue significativo para todos los ejes considerados. Los factores ambientales con mayor valor predictivo fueron las variables fisicoquímicas: conductividad, oxígeno disuelto, velocidad, concentración de  $\text{NH}_4^+$  y de FRS y las biológicas: clorofila *a* y carga bacteriana. El ordenamiento explicó 42,7 % de la varianza de la relación entre especies y ambiente (ejes 1 y 2 del ACC (B)). Estos primeros dos ejes reflejaron la distribución de especies y sitios con respecto a un gradiente de disturbio. La conductividad, carga bacteriana y concentración de clorofila *a* (cargas negativas) y el oxígeno disuelto y la velocidad (cargas positivas) presentaron las correlaciones más fuertes con el eje 1.

Los niveles de amonio y PRS estuvieron correlacionados positivamente con el eje ACC2. Los sitios menos disturbados (referencias: R1 y E1), que presentaron buena oxigenación y tuvieron velocidades altas de la corriente estuvieron localizados en el extremo positivo del eje 1, mientras que aquellos sitios con bajos contenidos de oxígeno y altos valores de conductividad, presencia de bacterias y clorofila *a* (I3, I4) fueron posicionados en el extremo negativo del ACC1 (Fig 34A). Los sitios que presentaron concentraciones altas de amonio y PRS (I2, R3) se ubicaron en el lado positivo del eje ACC2.

La ubicación de los ensambles de macroinvertebrados a lo largo de los mismos gradientes se muestra en el biplot de la Fig. 35B. *Metamonius anceps*, *Antarctoperla michaelsoni*, *Monocosmoecus* sp., *Udamocercia arumifera*, *Rheochorema* sp., *Nousia bella* (especies del grupo EPT) alcanzaron su densidad máxima o fueron encontrados en gran cantidad en los sitios bien oxigenados y de aguas con buen caudal. La mayoría de las especies que fueron comunes en los sitios que presentaron alta conductividad, alta carga

bacteriana y niveles altos de clorofila *a* fueron indicadores de degradación o taxa tolerantes como Tubificidae, *Biompahalaria* sp., *Pseudochironomus* sp., *Parachironomus* sp. y Ephydriidae sp., y se ubicaron en el ordenamiento en el cuadrante inferior izquierdo. Otros taxones asociados a altas concentraciones de nutrientes (PRS y amonio) fueron *Orthocladius* sp1, Ostracoda sp., Thaumaleidae sp., y Nadidae, que fueron agrupados en el cuadrante superior izquierdo.

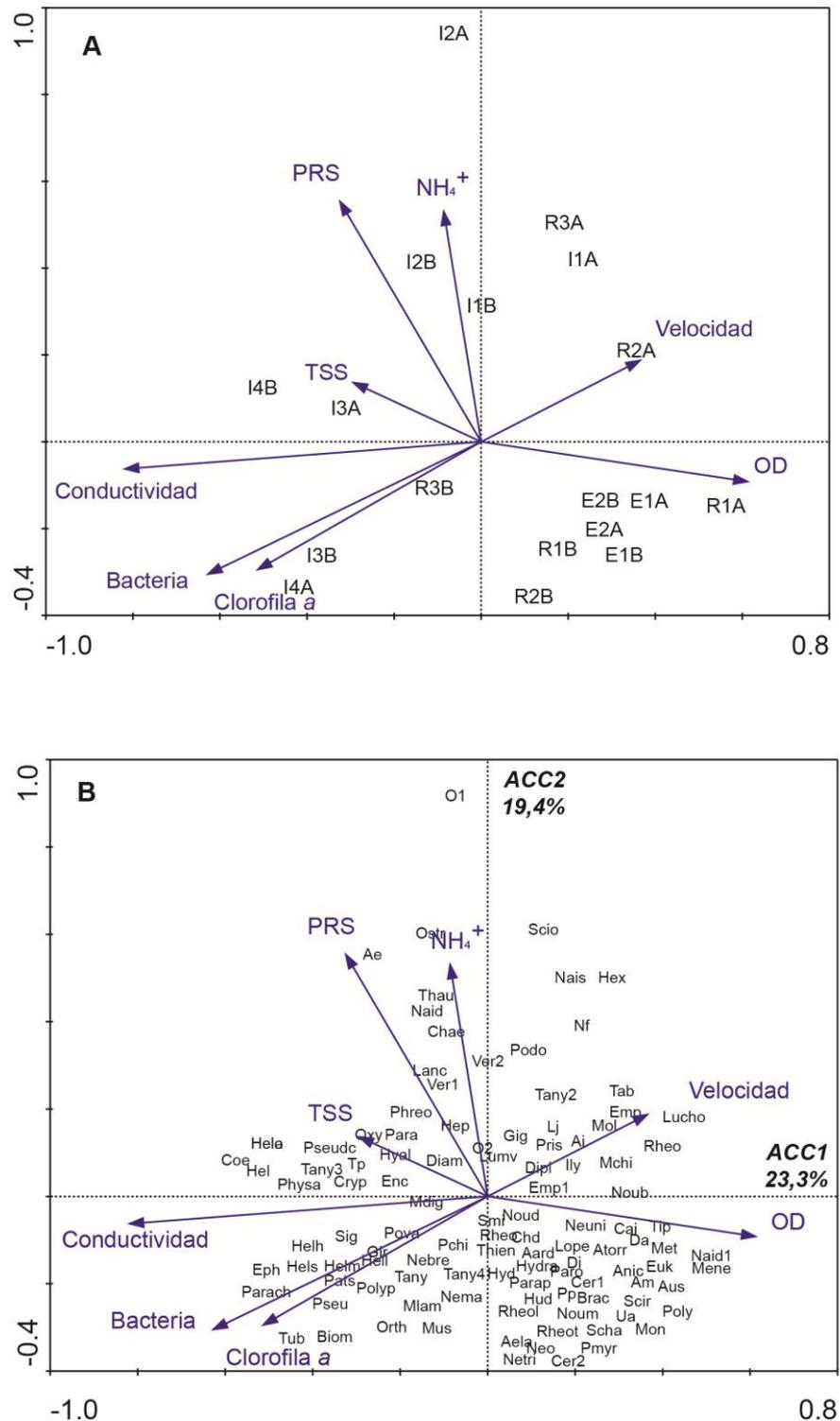


Figura 35. A) Diagrama de ordenamiento según el análisis de correspondencias canónicas (ACC) de los sitios de estudio en los arroyos Ruca, Enna e Ingram y las variables ambientales. El análisis fue realizado en base a los datos de abundancia (111 taxones) de macroinvertebrados. Los códigos de los sitios se encuentran en la Tabla 1.A: Período de aguas altas (Agosto 2015), B: Período de aguas bajas (Octubre Noviembre 2015). B) Ordenamiento de los taxa de

macroinvertebrados de acuerdo a los dos primeros ejes del ACC. Los códigos de las especies se indican en la Tabla 11.

Tabla 14. Resultados del análisis de correspondencias canónicas entre las variables ambientales y la abundancia de especies de macroinvertebrados bentónicos provenientes de los sitios de estudio (Noroeste de la provincia de Chubut, Patagonia Argentina). Los resultados del test de Monte Carlo se detallan en las últimas filas de la tabla.

Variable	Eje	
	ACC1	ACC2
Conductividad	-0,81	-0,06
Oxígeno disuelto	0,61	-0,09
Total de sólidos en suspensión	-0,29	0,14
Amonio	-0,08	0,53
Fósforo reactivo soluble	-0,32	0,55
Clorofila <i>a</i>	-0,51	-0,29
Bacterias	-0,63	-0,30
Velocidad	0,36	0,19
<b>Autovalores</b>	0,29	0,24
<b>Correlaciones especie ambiente</b>	0,99	0,94
Porcentaje acumulado de la varianza		
de especies	13,8	25,3
de la relación especie-ambiente	23,3	42,7
<b>Test de significación de los ejes canónicos</b>		
Primer eje canónico:	<b>F=1.44, p&lt;0.0002</b>	
Todos los ejes canónicos:	<b>F=1.62, p&lt;0.0001</b>	

#### 4.7.2 Análisis de correlación

Se realizó un análisis de correlación de Spearman para evaluar la correlación de los valores de las métricas en respuesta a variables ambientales relacionadas con la calidad del agua como el amonio, la conductividad eléctrica, la bacteriología, entre otras. Se obtuvieron varias relaciones esperadas y significativas (Fig. 36). Se identificaron numerosas correlaciones significativas entre ciertas medidas de riqueza y el amonio, lo que sugirió efectos tóxicos del mismo sobre grupos de especies sensibles.

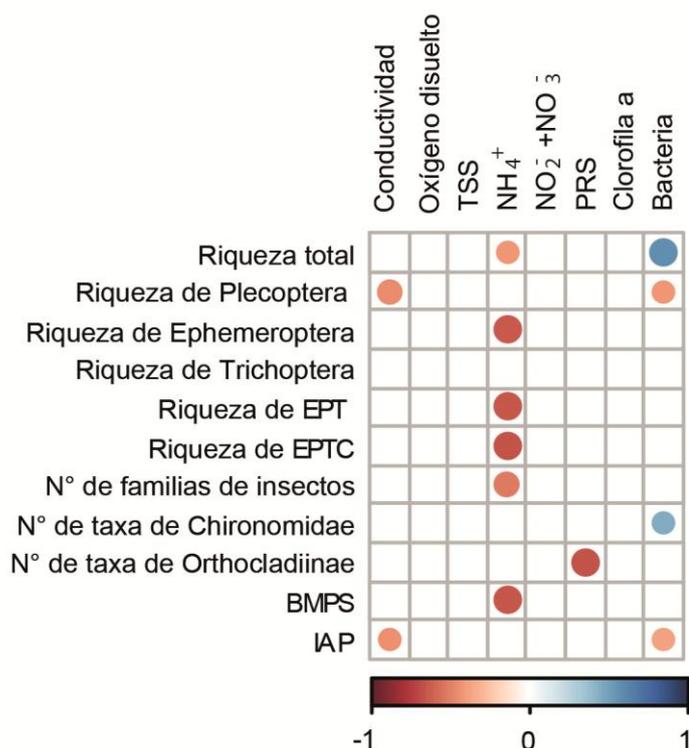


Figura 36. Matriz de correlación de métricos de macroinvertebrados bentónicos y variables ambientales relacionadas con la calidad del agua. Los círculos azules y rojos representan relaciones positivas y negativas, respectivamente. El tamaño de los círculos indica la magnitud de la correlación, y cuando están presentes significa que la correlación es significativa  $p < 0.05$ .

#### 4.7.3 Modelos lineales generalizados

De acuerdo con los modelos que mostraron mejor ajuste, las métricas Riqueza de EPT y Número de familias de insectos estuvieron relacionadas negativamente con la concentración de amonio presente en el curso de agua (Fig. 37, Tabla 15). Para las métricas Densidad de Colectores recolectores y Densidad de organismos Tolerantes, los mejores modelos incluyeron una lista de predictores ambientales mayormente relacionados con altos niveles de disturbio. Por lo tanto, una mayor densidad de estos grupos fue encontrada en sitios con valores altos de conductividad eléctrica, total de sólidos en suspensión, altas concentraciones de nitritos + nitratos y clorofila *a* (Tabla 15).

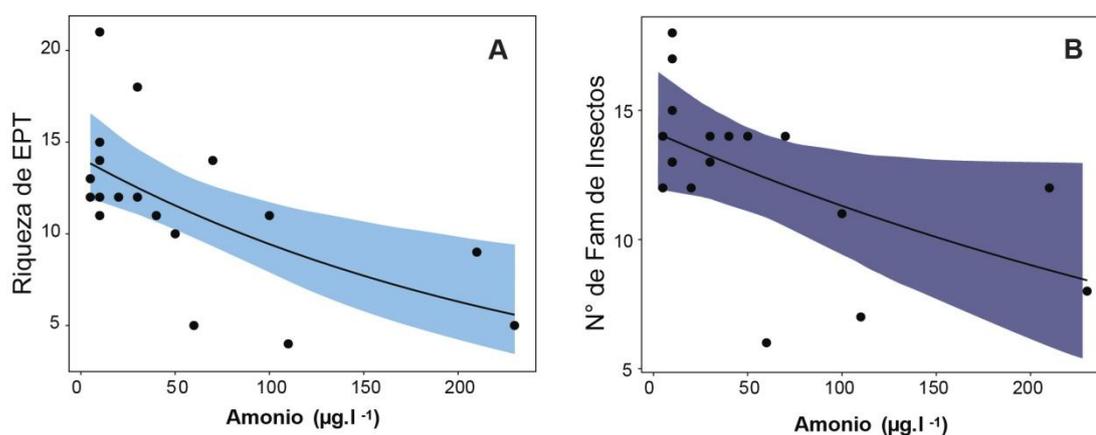


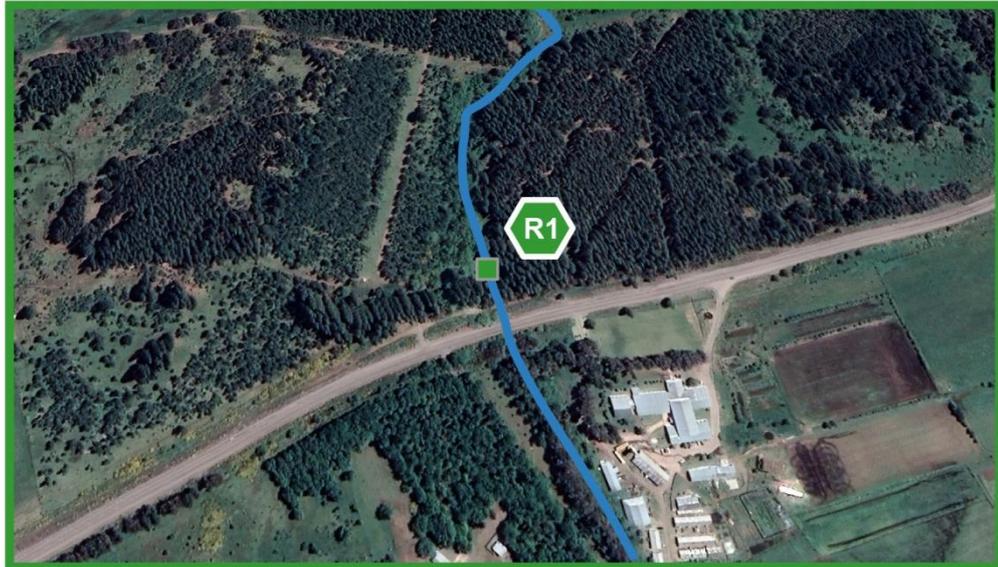
Figura 37. Curvas de respuesta para los modelos A) Riqueza de EPT y B) Número de familias de insectos en relación a la concentración de amonio. Los valores ajustados (línea sólida negra) se obtuvieron por medio de modelos lineales generalizados de efectos mixtos y se presenta el intervalo de confianza asociado del 95 % (área sombreada). Los puntos negros indican los valores observados.

Tabla 15. Resultados de los modelos lineales generalizados de efectos mixtos. Los MLGM resultaron del efecto de los predictores ambientales sobre las métricas comunitarias de macroinvertebrados acuáticos. Se muestran en la tabla las variables explicativas, los parámetros estimados ( $\beta$ ) ( $\pm$  error estándar) y los intervalos de confianza (IC).

Modelo	Variables explicatorias	$\beta \pm EE$	z value	p value	IC inferior	IC superior
Riqueza de EPT	Intercepto	2,4 $\pm$ 0,07	33,8	2e <sup>-16</sup>	2,3	2,6
	Amonio	-0,3 $\pm$ 0,09	-3,05	0,002	-0,4	-0,1
Nº de Fam de Insectos	Intercepto	2,5 $\pm$ 0,07	37,6	2e <sup>-16</sup>	2,4	2,6
	Amonio	-0,2 $\pm$ 0,08	-1,9	0,04	-0,3	-0,001
BMPS	Intercepto	4,6 $\pm$ 0,1	54,9	2e <sup>-16</sup>	4,5	4,8
	Nitrato + Nitrito	0,2 $\pm$ 0,03	6,04	1,5e <sup>-09</sup>	0,1	0,2
	Clorofila <i>a</i>	0,2 $\pm$ 0,03	5,4	6,9e <sup>-08</sup>	0,1	0,2
Densidad Total	Intercepto	8,6 $\pm$ 0,2	39,3	2e <sup>-16</sup>	8,1	9
	Conductividad	0,8 $\pm$ 0,2	4,3	1,6e <sup>-05</sup>	0,4	1,1
	Nitrato + Nitrito	0,2 $\pm$ 0,1	2,6	0,01	0,06	0,4
Densidad de Colectores recolectores	Intercepto	7,9 $\pm$ 0,3	30,1	2e <sup>-16</sup>	7,3	8,4
	Conductividad	0,5 $\pm$ 0,2	3,4	0,0007	0,2	0,9
	Total de sólidos en suspensión	0,4 $\pm$ 0,1	3,1	0,002	0,1	0,6
	Nitrato + Nitrito	0,5 $\pm$ 0,1	3,8	0,0001	0,2	0,7
Densidad	Clorofila <i>a</i>	0,3 $\pm$ 0,1	2,9	0,003	0,1	0,6
	Intercepto	7,9 $\pm$ 0,2	36,8	2e <sup>-16</sup>	7,5	8,3

<b>de Tolerantes</b>	Conductividad	0.7±0.2	3.7	0.0002	0.3	1.1
	Total de sólidos en suspensión	0.5±0.1	4	5.5e <sup>-05</sup>	0.3	0.8
	Nitrato + Nitrito	0.3±0.1	2.3	0.02	0.04	0.5
	Clorofila <i>a</i>	0.3±0.1	2.4	0.02	0.05	0.5

A continuación se muestran fichas de resúmenes con la información más destacada de cada uno de los sitios estudiados. Dichas fichas incluyen imágenes representativas de los sitios, una imagen satelital de cada uno de los mismos, así como los índices ICH, QBRp, la vegetación predominante y los taxa de macroinvertebrados dominantes.



**Taxones de Macroinvertebrados mayoritarios**



*Aubertoperla illiesi*

*Nousia minor*

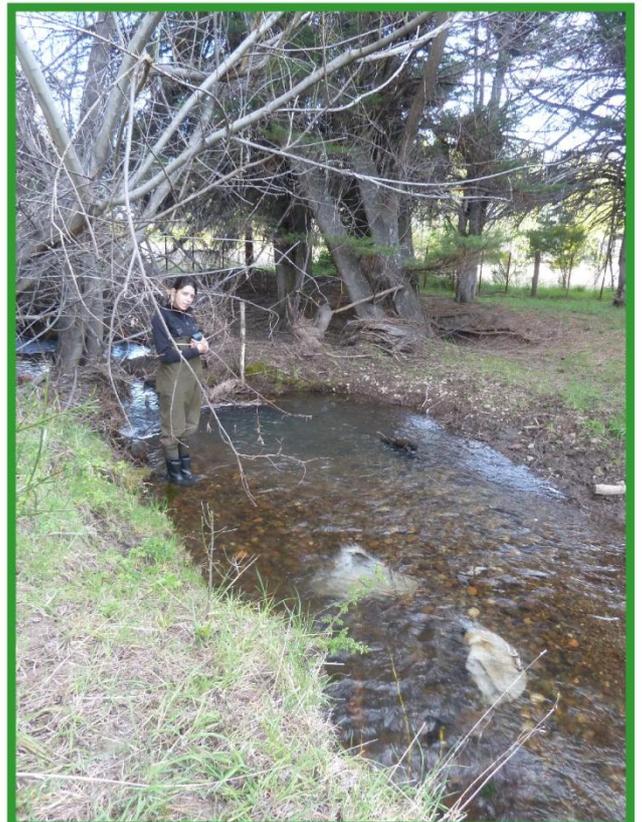
*Gigantodax sp.*

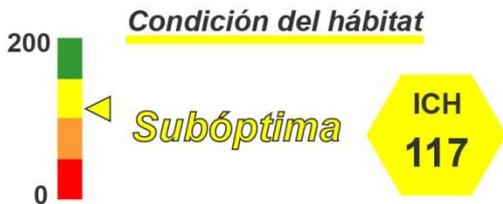


**Vegetación dominante**

**Macrófitas**  
Ausentes

**Ribera y matriz**  
*Poacea sp.*  
*Salix spp.*  
*Pinus ponderosa*





**Taxones de Macroinvertebrados mayoritarios**

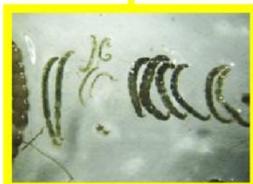


*Aubertoperla illiesi*



*Lumbriculus bariegatus*

Chironomidae



**Vegetación dominante**

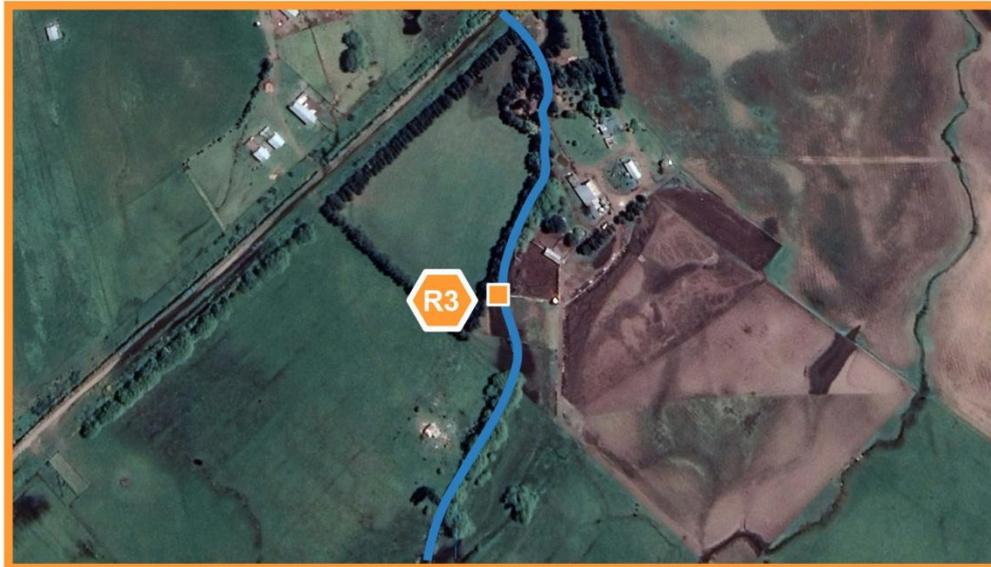
**Macrófitas**

*Erythranthe glabrata* 2%  
*Veronica anagallis-aquatica* 2%

**Ribera y matriz**

*Poacea* sp.  
*Rosa rubiginosa*  
*Salix* spp.





**Taxones de Macroinvertebrados mayoritarios**



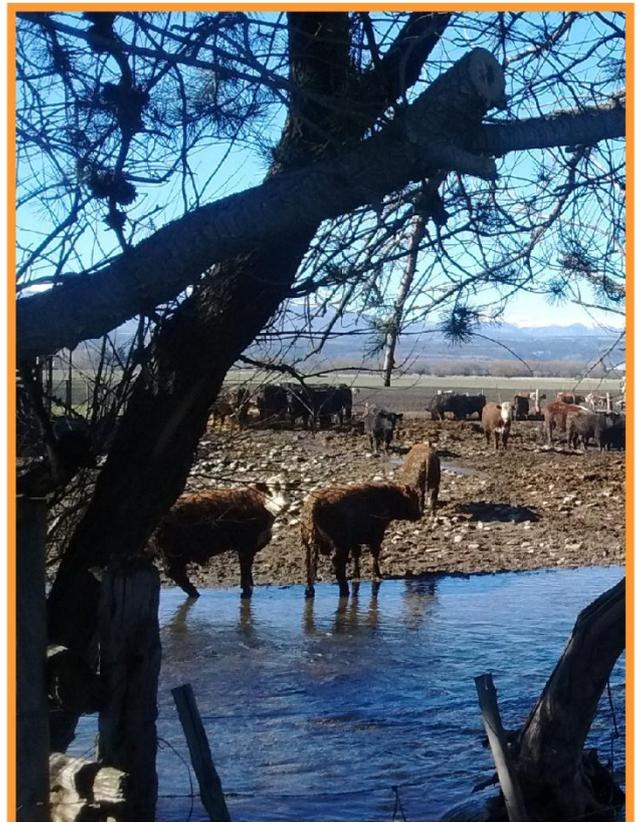
*Lumbriculus variegatus*

Chironomidae



**Vegetación dominante**

<p><b>Macrófitas</b> Ausentes</p>
<p><b>Ribera y matriz</b> Salix spp. Pinus contorta Pinus radiata</p>





**Vegetación dominante**

**Macrófitas**

- Myriophyllum quitense* 70%
- Veronica anagallis-aquatica* 20%
- Juncus pallescens* 15%
- Callitriche lechleri* 10%
- Ranunculus flagelliformis* 10%

**Ribera y matriz**

- Acaena magellanica*
- Ochetophila trinervis*
- Schinus patagonicus*
- Berberis microphylla*
- Salix* spp.

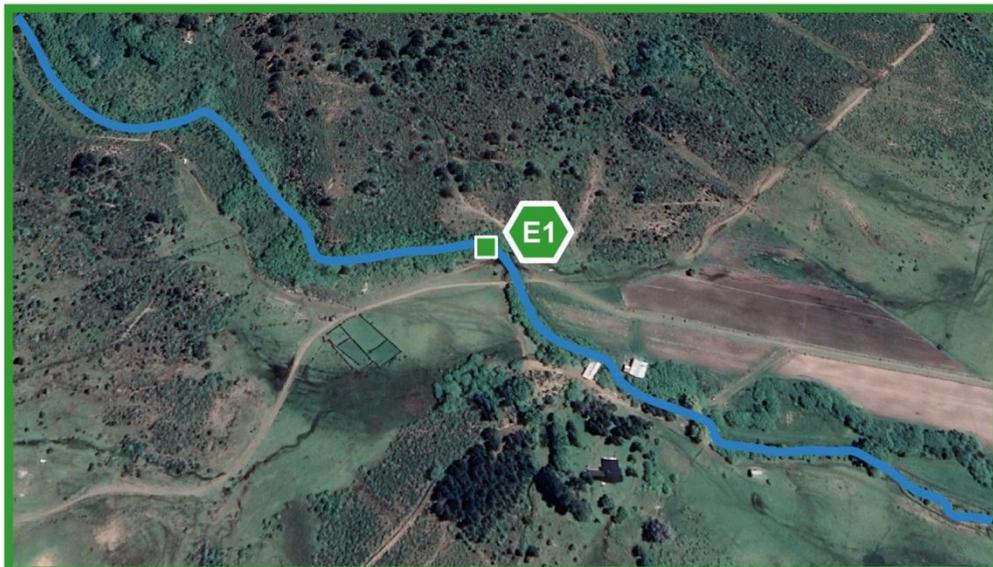
**Taxones de Macroinvertebrados mayoritarios**



*Aubertoperla illiesi*

Chironomidae

*Gigantodax* sp.





**Vegetación dominante**

**Macrófitas**

*Myriophyllum quitense* 30%  
*Veronica anagallis-aquatica* 3%

**Ribera y matriz**

*Poaceae* spp.  
*Verbascum thapsus*  
*Conium maculatum*  
*Arctium minus*  
*Brassica rapa*  
*Salix* spp.

**Taxones de Macroinvertebrados mayoritarios**

**Condición del hábitat**



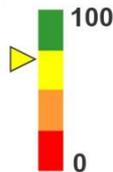
*Óptima*

ICH  
133

**Calidad de la ribera**

QBRp  
69

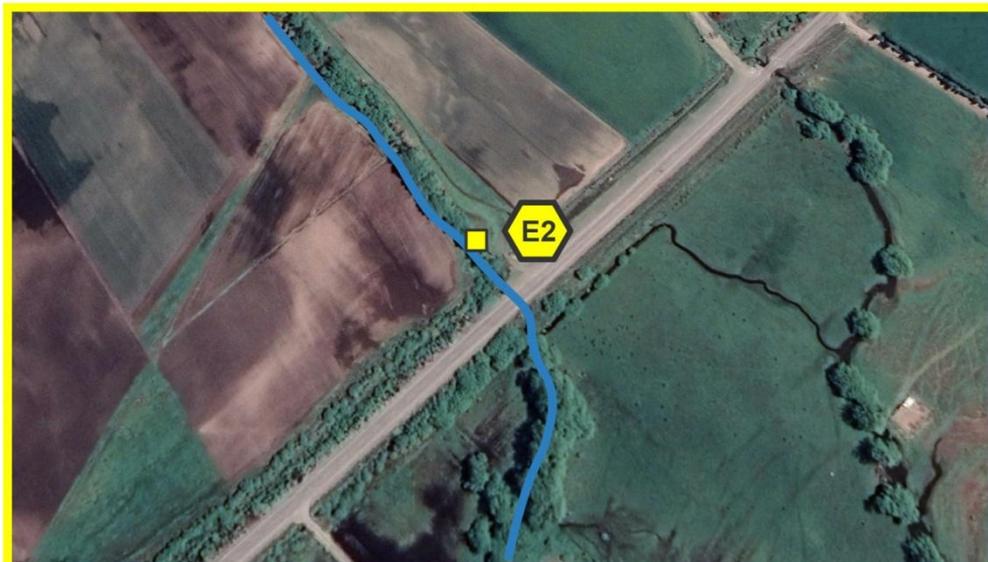
*Buena*



*Lumbriculus variegatus*

Chironomidae

*Gigantodax* sp.



**Vegetación dominante**

**Macrófitas**

*Veronica serpyllifolia* 2%

**Ribera y matriz**

- Acaena magellanica*
- Ochetophila trinervis*
- Schinus patagonicus*
- Berberis microphylla*
- Austrocedrus chilensis*



**Taxones de Macroinvertebrados mayoritarios**



*Auberterperla illiesi*

*Gigantodax* sp.

*Verger* spp.

*Limnoperla jaffueli*



Chironomidae



**Condición del hábitat**



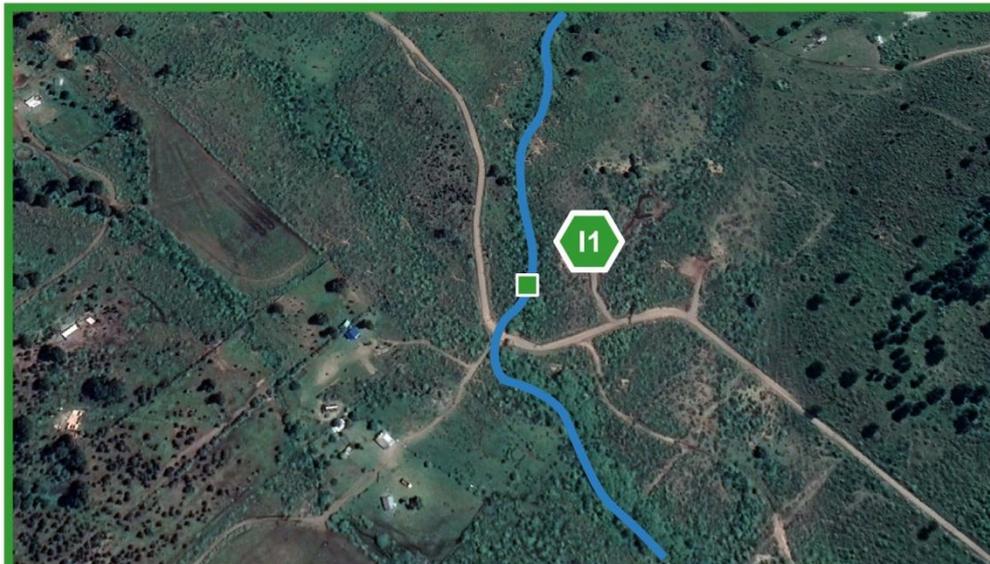
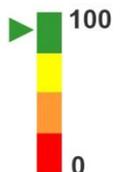
**Óptima**



**Calidad de la ribera**



**Buena**



**Vegetación dominante**

**Macrófitas**  
Ausentes

**Ribera y matriz**  
Poaceae spp.  
Rosa rubiginosa  
Salix spp.



**Taxones de Macroinvertebrados mayoritarios**



Gigantodax sp.



Lumbriculus variegatus

Chironomidae



**Condición del hábitat**



Subóptima

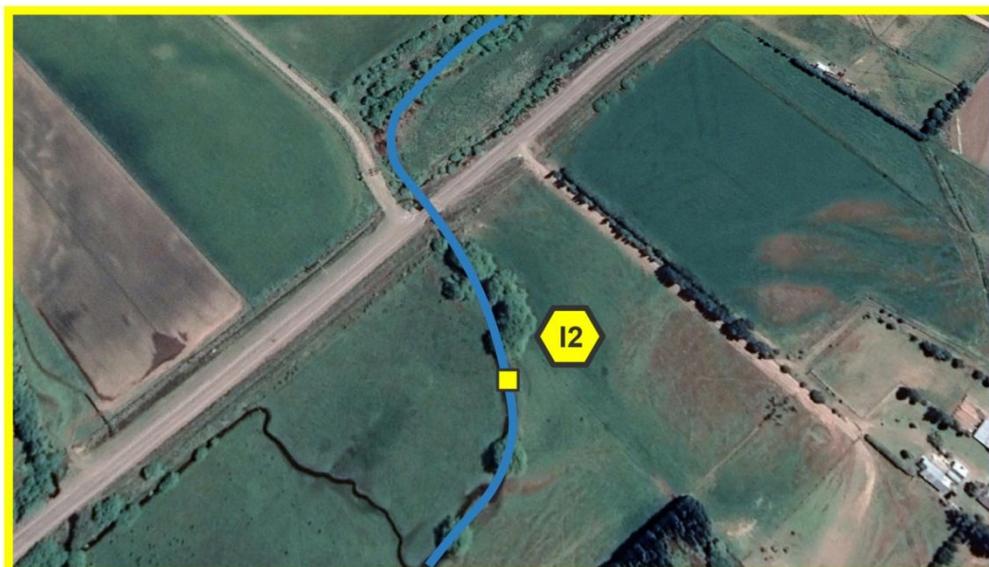
ICH  
117

**Calidad de la ribera**



QBRp  
57

Alterada



**Vegetación dominante**

**Macrófitas**

*Myriophyllum quitense* 60%  
*Erythranthe glabrata* 10%  
*Veronica anagallis-aquatica* 10%

**Ribera y matriz**

*Poaceae* spp.  
*Mentha aquatica*  
*Rosa rubiginosa*  
*Salix* spp.  
*Betula pendula*



**Taxones de Macroinvertebrados mayoritarios**



*Hyalella curvispina*

*Lumbriculus variegatus*



Chironomidae



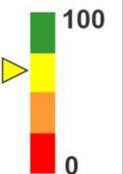
**Condición del hábitat**



*Subóptima*

ICH  
144

**Calidad de la ribera**



QBRp  
60

*Alterada*



**Vegetación dominante**

**Macrófitas**

*Veronica anagallis-aquatica* 5%  
*Myriophyllum quitense* 3%  
*Callitriche lechleri* 3%

**Ribera y matriz**

*Conium maculatum*  
*Ochetophila trinervis*  
*Berberis microphylla*  
*Rosa rubiginosa*  
*Salix* spp.



**Taxones de Macroinvertebrados mayoritarios**



*Hyalella curvispina*

*Parasericostoma ovale*



Chironomidae



**Condición del hábitat**



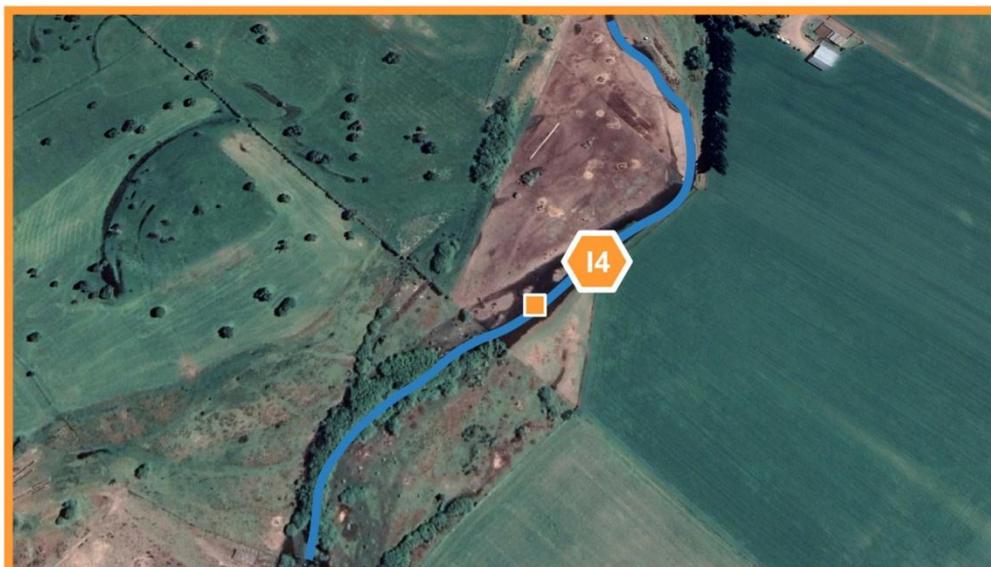
**Marginal**

ICH  
96

**Calidad de la ribera**

QBRp  
42

**Fuertemente alterada**





# DISCUSIÓN

## 5. DISCUSIÓN

Durante el presente trabajo de tesis se evaluó la calidad del agua y el estado ecológico de diferentes arroyos de piedemonte cordillerano, sometidos a distintas prácticas agropecuarias. Para esto se utilizaron tres enfoques diferentes: 1) una caracterización ambiental que incluyó la determinación de parámetros físicoquímicos del agua y la evaluación de los atributos de la vegetación del lecho, de la ribera y el entorno o zona buffer, así como su estado de conservación y el nivel de intervención. Asimismo se realizó una evaluación de los sitios utilizando macroinvertebrados para 2) valorar el nivel de contaminación de los sitios utilizando el sistema de defensa MXR de especies seleccionadas como biomarcadores de calidad de agua y finalmente 3) investigar la respuesta biótica de la comunidad a los estresores ambientales derivados del uso agropecuario examinando: las relaciones especie ambiente y diferentes métricas. Además, se realizaron ensayos *in vitro* para determinar la respuesta del sistema MXR ante la exposición a algunas de las sustancias más utilizadas en las diversas prácticas agropecuarias de la región bajo estudio, que podrían alcanzar los cursos de agua, como el herbicida glifosato, y el antiparasitario ivermectina. De esta manera se buscó hacer una evaluación integral de la calidad del agua de estos arroyos que en algunos sectores son utilizados por los pobladores como suministro hídrico para sus producciones agrícolas, hortícolas y principalmente ganaderas.

### *Características ambientales de arroyos de piedemonte en relación al uso agropecuario*

A partir de la caracterización físicoquímica del agua realizada, el presente estudio mostró que la producción de animales en confinamiento tanto de manera intensiva como semi-intensiva resultó en un efecto bajo a moderado sobre la conductividad, la concentración de oxígeno disuelto y los niveles de nutrientes de los sitios afectados. El cambio reflejado en la primer variable podría deberse al incremento en la concentración de iones disueltos producto de la incorporación de sustancias por escorrentía, por la erosión y el transporte de materiales desde el área circundante y/o por el aporte de excretas del ganado. Algo similar fue registrado en Nueva Zelanda, en sitios asociados al desarrollo de pasturas y cría de ganado (Shilla y Shilla 2004). En el presente trabajo,

los sitios más perturbados resultaron E4 e I4, los cuales mostraron incrementos superiores al 200 % en la conductividad del agua respecto a los sitios de referencia.

Como se esperaba, para arroyos templados fríos en el área (Brand y Miserendino 2015), la mayoría de los sitios estuvieron bien oxigenados, aunque un descenso en la concentración de oxígeno fue evidente en los sitios aguas abajo en los sistemas Ingram (30 a 50%) y Enna (60%) en verano. Esto pudo deberse al incremento en la materia orgánica y en la actividad bacteriana de los sitios (Sánchez et al. 2007; Scanes 2018), así como al incremento de la temperatura del agua, que disminuye la cantidad de oxígeno disuelto. Si bien este aumento de temperatura no fue estadísticamente significativo, sí pudo apreciarse un incremento gradual en el valor promedio de este parámetro de  $E1 > E4$  e  $I1 > I4$ . Este resultado fue congruente con lo encontrado por Shilla y Shilla (2004) en el que asociaron una disminución del oxígeno disuelto no solo al incremento de actividad bacteriana sino también al aumento de la temperatura de los cursos de agua, como consecuencia de la disminución del sombreado por pérdida de la vegetación de ribera.

Si bien en el sitio R3, que estuvo asociado a un sistema de producción de animales en forma intensiva, no se apreciaron cambios significativos en los valores medios de conductividad y de oxígeno disuelto, sí se observó un incremento marcado del TSS (seis veces mayor que el sitio de referencia correspondiente) durante los meses de verano. Esto también pudo observarse en los sitios E3 y E4 cuyo uso de la tierra fue la producción de pasturas y la cría de ganado bovino en modalidad semi-intensiva. Se han documentado aumentos en la concentración de sólidos en suspensión, incrementos en la sedimentación y en la turbidez en arroyos asociados a actividades ganaderas, que podrían deberse a procesos de erosión y transporte incrementados por el pisoteo producido por los animales. Además, los procesos de labranza de la tierra que producen movimientos de suelos, también contribuyen a aumentar la cantidad de sedimentos finos que alcanzan los cursos de agua (Davies-Colley et al. 2004; Declerck et al. 2006; Niyogi et al. 2007; O'Sullivan et al. 2019).

Los niveles de nutrientes aquí observados fueron marcadamente altos en comparación con aquellos reportados para el manejo ganadero extensivo en arroyos de piedemonte de la región patagónica (Miserendino et al. 2011), pero similares a los

documentados para ganadería intensiva en áreas de humedales (Kutschker et al. 2014; Epele y Miserendino 2015). En relación a las concentraciones de amonio, si bien los valores medios de este nutriente solo mostraron diferencias significativas entre el sitio E4 con respecto a su sitio de referencia, si se encontraron valores extremos que ocurrieron en sitios con presencia de ganado en las márgenes de los arroyos o en los meses con mayores cargas ganaderas, en coincidencia con lo observado por otros autores (García et al. 2015). También, Riley y colaboradores (2003) observaron incrementos de amonio en arroyos sujetos a pastoreo (Nueva Zelanda), asociados al aumento de la carga ganadera, que podrían deberse tanto al aumento de excretas de los animales en el curso de agua y sus riberas, como a los procesos de degradación de las mismas dentro del ambiente acuático (Kato et al. 2009; De los Santos et al. 2018). Además, pudo apreciarse un aumento en la concentración de este nutriente en el sitio I2, que si bien no se encuentra asociado a la producción de ganado, presenta desarrollos hortícolas en sus proximidades. A pesar de que la escala de estos emprendimientos es pequeña (familiar), es frecuente el uso de fertilizantes nitrogenados que pueden alcanzar los cuerpos de agua por escorrentía e infiltración.

Las concentraciones medias de  $\text{NO}_3+\text{NO}_2$ , por su parte, no mostraron cambios significativos a lo largo de los tres arroyos estudiados aunque los valores encontrados fueron mayores a los registrados en arroyos de similares características afectados por ganadería extensiva (Brand y Miserendino 2015). El PRS también presentó valores medios superiores a los encontrados en arroyos similares utilizados para pasturas en modalidades extensivas (Miserendino et al. 2011). Esto pudo observarse en particular en el sitio E4, en el cual si bien la carga ganadera no fue particularmente alta (modalidad semi-intensiva), presentó coberturas de macrófitas menores al sitio de referencia del curso de agua respectivo. El aporte de PRS producido por la deposición directa de excretas en el cuerpo de agua, así como la llegada del mismo por escorrentía e infiltración, sumado a la escasez de plantas acuáticas que contribuyan con la retención de este nutriente, podrían ser responsables, en parte, de este fenómeno (Schwarte et al. 2011). Dinámicas de nutrientes similares fueron encontradas por Mesa y colaboradores (2015) en ambientes de humedales en la sección media del río Paraná asociadas a sistemas de pastoreo rotativos. Estos autores además, destacan que el manejo rotativo de los animales podría ayudar a minimizar el incremento de este y otros nutrientes en el

agua, colaborando con el mantenimiento de la integridad ecológica de los cuerpos de agua.

Los resultados muestran que el ganado puede afectar la distribución de los nutrientes cuando tiene acceso sin restricciones a los cursos de agua (Miller et al. 2010b; McKergow et al. 2012; Bond et al. 2014; Mesa et al. 2016). Esto se debe a que tienden a depositar mayor cantidad de excretas en los arroyos o en áreas de descanso (usualmente más sombreadas) próximas a los mismos. Esto ha sido demostrado en trabajos que evaluaron los efectos de la exclusión de los animales de los cursos de agua (Davies-Colley et al. 2004; Miller et al. 2010a). Si bien el presente diseño intentó evaluar los efectos de diferentes modalidades de producción ganadera, como así también de los cultivos forrajeros y hortícolas, sobre la calidad de arroyos asociados a estas prácticas, no contempló otras fuentes de disturbio que podrían contribuir a explicar los patrones observados en los niveles de nutrientes. En este sentido, otros fenómenos asociados los cambios en el uso de la tierra, como el aumento de la escorrentía superficial (Guzha et al. 2018), la alteración de los procesos de infiltración por cambios en las propiedades físicas del suelo (Frolla et al. 2018), así como los procesos de degradación de la materia orgánica aportada por las excretas (Mesa et al. 2015), deberían ser considerados para poder comprender mejor los cambios que se documentaron en los niveles de nutrientes.

La producción de biomasa epilítica registrada (clorofila *a*), mostró aumentos en los sitios asociados a sistemas de producción de animales en confinamiento. Esto pudo deberse al enriquecimiento en nutrientes producido por la orina y la materia fecal de los animales, combinados con una alta exposición solar (sitios con dosel abierto) y una baja profundidad de los cauces. Estas características que presentaron los sitios resultó en un aumento de productores primarios (Niyogi et al. 2007; Miserendino et al. 2016). Sin embargo, el parámetro clorofila *a*, no siempre es útil para discriminar el efecto del pastoreo sobre los cursos de agua. Esto podría deberse a que el desarrollo de los microorganismos que crecen sobre las rocas se ve afectado no solo por los cambios en los nutrientes y la cantidad de luz solar que alcanza el lecho del río, sino también por el efecto erosivo que producen los sólidos en suspensión que llegan al curso de agua y que se ven incrementados por la acción del pisoteo del ganado (Scrimgeour y Kendall 2003; Masi y Miserendino 2009; Cortelezzi et al. 2013).

La cantidad de bacterias coliformes presentes, por su parte varió significativamente entre los sitios de estudio. La presencia de *E. coli* en el agua es un fuerte indicador de una reciente contaminación por aguas residuales o contaminación con residuos de animales. Además, la presencia de *E. coli* puede ser indicativo de la contaminación con otras bacterias, virus o protozoos que pueden causar diferentes enfermedades (Rock y Rivera 2014). El conteo de *E. coli* mostró que la calidad del agua disminuyó tanto en los sitios que presentaron actividad ganadera semi-intensiva (I3, E3) como en los sistemas de cría de ganado en confinamiento (R3, I4). Durante el período de aguas altas, el conteo de estas bacterias aumentó 10 veces entre el sitio I1 y el sitio I4, y 4 veces entre el sitio R1 y el R3. En el período de aguas bajas, por su parte, el sitio R3 presentó 43 veces más *E.coli* que el sitio de referencia correspondiente a ese arroyo. Esto es similar a lo encontrado por Vidon y colaboradores (2008) y Davies-Colley y colaboradores (2004). En este último trabajo, los autores llegaron a registrar picos de hasta 50.000 UFC/100ml durante los momentos en los que los animales cruzan los cursos de agua.

Con respecto a las medidas de protección de aguas superficiales, los sitios con sistemas de cría de animales en confinamiento excedieron los valores críticos recomendados para *E. coli* (200 CFU/100ml) aún en el período de aguas altas (DPN°1540/2006 Pcia. de Chubut 2016; EPA 2012). Cabe destacar que el sitio I3 suele ser utilizado como espacio de recreación, dado que se encuentra próximo a caminos vecinales en una zona rural poco poblada. Este sitio superó la concentración recomendada de *E. coli* durante el período de aguas bajas, por lo que el acceso de personas a este curso de agua podría haber presentado un riesgo para la salud.

El valor guía indicado para *E. coli* fue sobrepasado incluso en lugares que presentaban alambrados, que excluían al ganado del curso de agua, lo cual probablemente pudo haber estado asociado a la escorrentía superficial desde las áreas circundantes (Collins y Rutherford 2004). Si bien existen numerosos trabajos que evalúan los cambios en las concentraciones de bacterias coliformes fecales antes y después de la exclusión del ganado de los arroyos, con resultados muy variados (Muirhead 2019), varios autores coinciden en que el uso de alambrados se presenta como una opción de mitigación útil no solo para reducir la contaminación fecal de los

cursos de agua, sino también para mejorar el estado ecológico de las riberas (Line 2003; Miller et al. 2010a; Bragina et al. 2017).

El análisis de componentes principales (ACP) integrando todas las variables ambientales registradas en las tres cuencas estudiadas discriminó los sitios en base a un marcado gradiente de disturbio. Las variables ambientales retenidas estuvieron fuertemente relacionadas con parámetros de calidad del agua asociados a procesos de degradación como el TSS, la concentración de amonio y la conductividad (Shilla y Shilla 2011; Scanes 2018).

Las actividades antrópicas como el cultivo de pasturas, la cría de ganado, o los aprovechamientos forestales generan alteraciones en la hidrología y la comunidad de plantas de un ambiente acuático determinado (Miserendino et al. 2010; Kutschker et al. 2014). En el caso particular de los ambientes lóticos, tanto el deterioro de las condiciones físicas y químicas de los arroyos, como los cambios en la vegetación de la ribera, pueden resultar en modificaciones de la comunidad de macrófitas (Rosso y Fernández Cirelli 2003; Cortelezzi et al. 2013). En el presente estudio se pudo apreciar una disminución en la riqueza absoluta y el porcentaje de cobertura de macrófitas en los sitios afectados por sistemas de producción ganadera intensiva y semi-intensiva (R3, I4 y E3) en comparación a los sitios no intervenidos en los mismos sistemas (R2, I3 y E1). Los sitios de referencia R1 e I1 por su parte, mostraron valores de estos parámetros menores a los sitios afectados por prácticas agropecuarias antes mencionados. Esto podría deberse a la acción del sombreado producido por la vegetación de ribera presente en los sitios y a la baja concentración de nutrientes. Miserendino et al. (2010) documentaron similares patrones en riqueza y cobertura de macrófitas en arroyos de áreas forestadas por pinos y bosques sin manejo forestal en la región.

Como se esperaba, se documentaron cambios consistentes en relación a la composición de la vegetación de ribera. Se pudo apreciar una disminución en la riqueza de especies en los sitios más disturbados (R3, E4 e I4) en contraste con los sitios de referencia. El ganado por forrajeo y pisoteo puede producir una disminución importante del número de especies tanto herbáceas como arbustivas en las márgenes de los arroyos. Diferentes trabajos que han evaluado el efecto de la exclusión de los animales de ambientes fluviales registraron mejoras en la salud de la ribera, aumentos en los

porcentajes de cobertura vegetal y disminución del porcentaje de suelo desnudo, y estas características ayudaron a prevenir la degradación de los ríos y arroyos estudiados (Miller et al. 2010a, 2011, Herbst et al. 2012).

Los diferentes resultados obtenidos en relación a la caracterización ambiental de los sitios mostraron cambios en distintos parámetros físico-químicos (ej. conductividad, TSS,  $\text{NH}_4^+$ ) y biológicos (clorofila *a*, *E. coli*) asociados al desarrollo de actividades agropecuarias intensivas y semi-intensivas. Estos cambios, en consecuencia, produjeron una degradación moderada de la calidad del agua y el ambiente, en concordancia con la hipótesis propuesta.

#### *Integridad de los ecosistemas acuáticos estudiados*

Como se esperaba, los valores máximos tanto del Índice de Calidad de Ribera como también el de Condición del hábitat, correspondieron a los sitios de referencia. Si bien algunos de ellos mostraron una degradación incipiente, fue la mejor condición posible dentro de los sistemas estudiados resultando similar a lo descrito en estudios realizados en cuencas cercanas (Miserendino et al. 2016). Además, la peor situación en términos de integridad ecológica fue identificada en arroyos que presentaban sistemas de cría de ganado en confinamiento.

Se han asociado efectos negativos en la calidad del hábitat de los arroyos con el uso de la tierra destinado al pastoreo (Miserendino et al. 2011). Los disturbios más comunes en el hábitat estuvieron relacionados con los procesos de erosión y el pisoteo del ganado que resultaron en un alto grado de incrustación, deposición de sedimentos finos y pérdida de la sinuosidad del canal lo que es similar a lo reportado por otros autores (Magner et al. 2008; Scanes 2018; O'Sullivan et al. 2019). Estos fenómenos, condujeron a la alteración de la secuencia de rápidos y pozones, a la monopolización del sustrato (por una especie de macrófita) y a la homogeneización de los cursos de agua, reduciendo así la disponibilidad de sustrato epifaunal y la heterogeneidad y complejidad de los ambientes, en coincidencia con lo registrado por Sutherland et al. (2012) y Brand y Miserendino (2015).

Las nuevas modalidades de cría de ganado en confinamiento están produciendo impactos significativos y negativos en los corredores ribereños y en las condiciones del hábitat dentro de los arroyos (Scrimgeour y Kendall 2003; Ranganath et al. 2009; Rosso y Fernández Cirelli 2013). Durante el presente estudio, la mayoría de los juicios de calidad del índice QBRp aplicado a los sistemas de cría en confinamiento indicaron una fuerte alteración del ecosistema ribereño. Como se esperaba, las mejores condiciones fueron encontradas en los sitios de referencia (Kutschker et al. 2009; Mesa et al. 2014). Sin embargo, en este trabajo se identificaron algunas alteraciones incluso en sitios de muestreo de localización intermedia (debajo de sitios de referencia), evidenciando otros tipos de disturbios derivados de la cría de ganado extensiva (Vidon et al. 2008; Kaucner et al. 2013). Aparentemente, incluso con cargas ganaderas bajas, los animales siguen alimentándose de pastos y estratos herbáceos en el corredor ribereño, mostrando cierta preferencia por estas áreas (Ranganath et al. 2009). Como aquí se documenta, el uso de suministros de agua o sistemas de abrevadero fuera del arroyo no es una práctica utilizada comúnmente, ni tampoco la exclusión de los animales de los cursos de agua con boyeros eléctricos o alambrados (Malan et al. 2018; Miller et al. 2018). Como dato significativo, la existencia de alambrados en R2 e I3 fue efectiva mejorando las condiciones de los ecosistemas ribereños en los cuales el criterio de juicio resultó en valores más altos (mejor calidad) que los sitios sin exclusión.

Las características estructurales de los arroyos y sus riberas condicionan el desarrollo de las comunidades que allí se desarrollan. La heterogeneidad del hábitat, posibilita la coexistencia de un mayor número de organismos, incrementando la biodiversidad. En ambientes acuáticos, la biodiversidad presente puede mejorar el funcionamiento del ecosistema (Cardinale et al. 2002; Giller et al. 2004), beneficiando no solo a las comunidades que allí se desarrollan, sino también mejorando la calidad del agua del cual el ser humano hace uso. Es por esto que los índices que valoran la calidad de los ambientes acuáticos, pueden ser considerados como una herramienta útil para generar alertas tempranas en áreas donde se desarrollan diferentes actividades antrópicas y esto ha sido demostrado en diversos trabajos alrededor del mundo (Arnaiz et al. 2010; D' Ambrosio et al. 2014; O'Sullivan et al. 2019; Taniwaki et al. 2019).

*Actividad MXR y puesta a punto de la técnica de bioacumulación en moluscos Chilina dombeiana y Physa acuta.*

El mecanismo de multixenobiótico resistencia (MXR) que involucra la actividad de proteínas de la familia ABC, entre ellas la P-glicoproteína (P-gp), ha sido considerado como una defensa biológica de muchos organismos acuáticos frente a sustancias tóxicas presentes en el ecosistema (Kurelec 1997; Epel et al. 2008). Existen registros recientes que demuestran la funcionalidad de este mecanismo en especies de organismos de Patagonia como el molusco dulceacuícola exótico *Physa acuta*, en tres especies de hirudíneos: *Helobdella michaelsoni*, *Helobdella simplex* y *Patagoniobdella variabilis* (Assef et al. 2014 a y b) y en diferentes tejidos de cuatro especies de peces (nativas y exóticas) presentes en el noroeste de Chubut (Assef et al. 2019). Para poder obtener evidencias de que este sistema se expresa y es funcional en los moluscos existentes en los sitios seleccionados para este estudio, fue necesario realizar pruebas de funcionalidad utilizando el sustrato fluorescente Rodamina B (RB) y un inhibidor específico de P-gp (verapamilo), y así poner a punto la técnica de bioacumulación utilizada. Al evaluar diferentes tiempos de exposición a la RB (5  $\mu$ M) en las especies *Physa acuta* y *Chilina dombeiana* se apreció un leve incremento en la acumulación de RB en los individuos del grupo control de ambas especies al aumentar el tiempo de exposición. En todos los casos la bioacumulación del sustrato se incrementó en presencia de verapamilo. Sin embargo, los valores R obtenidos indicaron que el tiempo que permitió detectar la mayor actividad MXR (reflejado como un menor índice R) fue de 4 h en *P. acuta* y entre 4 y 6 h en *C. dombeiana*. Se definió así utilizar el tiempo de exposición de 4 h para los ensayos de bioacumulación que se realizaron, ya que es el menor tiempo que permite detectar el máximo nivel de actividad.

Dado que se ha observado que este sistema de transporte de membrana se satura en algunas especies a altas concentraciones de fluorescente (Toomey y Epel 1993), se realizaron ensayos a diferentes concentraciones de RB en la solución de incubación. Los resultados mostraron que, en ambas especies, los organismos acumularon RB en forma proporcional a la concentración utilizada. En presencia de verapamilo, los moluscos incubados en concentraciones de 5 y 10  $\mu$ M de RB acumularon más fluorescente que los que fueron incubados en a 1  $\mu$ M. Al analizar los valores R obtenidos para cada concentración se pudo apreciar que los resultados no mostraron diferencias

significativas en la actividad MXR alcanzada entre los organismos expuestos a concentraciones de 5 y 10  $\mu\text{M}$  de RB en ninguna de las dos especies estudiadas. Por esto se definió utilizar la concentración de 5  $\mu\text{M}$  de RB en los ensayos subsiguientes.

Finalmente se evaluó la acumulación de RB en relación a la presencia de diferentes concentraciones de verapamilo en el medio de incubación, en organismos de ambas especies. En ambos casos los valores de acumulación de RB tendieron a estabilizarse entre las concentraciones de 30 y 50  $\mu\text{M}$  del inhibidor, alcanzando así su efecto máximo. Debido a esto, se seleccionó la concentración de 30  $\mu\text{M}$  de verapamilo como la concentración de inhibidor a utilizar en los restantes experimentos.

#### *Actividad MXR evaluada en los organismos presentes en los sitios de estudio*

El sistema MXR expresado en organismos acuáticos proporciona una primera línea de defensa contra los xenobióticos, sustancias de origen natural o antrópico potencialmente dañinas (Kurelec 1992). Dado que ese sistema puede ser inducido en respuesta a la exposición a compuestos tóxicos, y esos niveles son proporcionales a las concentraciones de los mismos, puede ser utilizado como un indicador del estado de salud del organismo (Minier et al. 1999). Además, estudios que midieron el nivel de expresión de proteínas de membrana que intervienen en este sistema de defensa en bivalvos, recolectados en sitios afectados por contaminación orgánica, mostraron una correlación entre la cantidad de proteínas y el nivel de contaminación de los sitios de estudio (Minier y Moore 1996; Minier et al. 2006). Es por esto que este sistema de defensa tiene el potencial para ser utilizado como un biomarcador útil en el diagnóstico ambiental.

Con el fin de evaluar la potencialidad del sistema MXR como biomarcador de calidad de agua en cuencas de piedemonte bajo uso agropecuario, se realizaron ensayos de bioacumulación de RB en moluscos de la especie *C. dombeiana* presentes en los sitios E1, E2 y E3, I3 e I4, y de la especie *P. acuta* encontrados en los sitios E3, E4, I3 e I4. Como se mostró anteriormente, los sitios presentaron diferentes niveles de disturbio producidos por las distintas actividades antrópicas que se desarrollaban asociadas a cada uno. Al analizar los resultados obtenidos, resultó de interés observar tanto la

acumulación de fluorescente en condiciones control, la cual determina el nivel de detoxificación general de los organismos (independientemente de las proteínas involucradas) (Dos Santos y Martínez 2014), como el índice R, que nos indica la fracción de la actividad MXR que depende en particular de P-gp (Smital et al. 2000).

Los ensayos de bioacumulación realizados en *C. dombeiana* provenientes de los sitios ubicados en el arroyo Enna mostraron una disminución en la acumulación de RB entre el sitio E2 y E3, que indica una mayor capacidad de detoxificación de los organismos existentes en E3. Esto podría estar asociado a un incremento en la concentración de compuestos tóxicos de este último sitio, relacionado con la actividad ganadera semi-intensiva que allí se desarrollaba. Este aumento observado en la funcionalidad del sistema de detoxificación MXR, sin embargo, no estaría mediado por P-gp, ya que los valores R entre ambos sitios fueron similares. Los resultados obtenidos de los sitios ubicados sobre el arroyo Ingram, por su parte, no mostraron diferencias en el nivel de detoxificación de RB, ni en el índice R. Esto se encuentra en concordancia con la escasa variabilidad que se registró entre los parámetros físicoquímicos de estos dos sitios y la presencia en ambos de actividad ganadera con distintos niveles de intensidad/acceso de los animales al curso de agua.

Los niveles de acumulación de RB evaluada en moluscos de la especie *P. acuta* provenientes de los sitios ubicados en el arroyo Enna mostraron una clara disminución en la concentración de fluorescente entre los sitios E3 y E4. Se observó un aumento leve pero significativo en la bioacumulación en presencia del inhibidor de P-gp para los moluscos colectados en E4, que no se vió reflejado en el valor R. El aumento de la capacidad de detoxificación general observada podría estar asociado a un aumento en el nivel de disturbio presente en el sitio E4 por el desarrollo de ganadería en modalidades semi-intensivas. El acceso irrestricto del ganado al ambiente acuático que estos moluscos habitan, es una vía de ingreso de sustancias, que podrían actuar como sustratos de este mecanismo de detoxificación produciendo así su inducción (Halley et al. 1989; Sanderson et al. 2007; Mesa et al. 2018). Además, este sitio se ubicó en un ambiente semiléntico, cuyas condiciones hidrológicas, podrían contribuir a que estas sustancias se depositen y permanezcan asociadas al sedimento y permanezcan en el sistema durante más tiempo, aumentando el nivel de exposición de estos organismos.

Con respecto al nivel de funcionalidad del sistema de detoxificación estudiado, registrado en individuos de la especie *P. acuta* provenientes de los sitios ubicados en el arroyo Ingram, los resultados mostraron una leve disminución en la acumulación de RB en condiciones control, entre el sitio I3 e I4. Sin embargo, los valores R de ambos sitios no difirieron significativamente, por lo que esta diferencia en la capacidad de detoxificación no se debería a un aumento de la actividad de P-gp y podría estar asociada al aumento del disturbio producido, como en el caso anterior, por el acceso del ganado al curso de agua.

Al comparar los valores R de los organismos *C. dombeiana* y *P. acuta* provenientes de los mismos sitios (E3, I3 e I4), si bien no pudieron observarse diferencias significativas entre los grupos analizados, si pudo apreciarse que en general, *C. dombeiana* presenta valores R ligeramente inferiores a los de *P. acuta*. Esto podría indicar que los organismos de la especie nativa presentaron una actividad MXR levemente mayor a los organismos de la especie exótica, es decir que los primeros requirieron de una inducción mayor del sistema para sobrevivir en el mismo ambiente. Esta característica, sumada a la menor tolerancia que presenta *C. dombeiana* frente a indicadores de eutrofización, podría ser responsable del modelado de la distribución de esta especie en áreas más acotadas que las de *P. acuta*. En este sentido, los requerimientos ecológicos más estrictos que presenta las especies nativas en relación a las exóticas (Miserendino et al. 2008; 2011), resaltan la importancia del uso de las primeras en estudios ecotoxicológicos, que permitan establecer parámetros de protección ambiental que resulten efectivos en el mantenimiento de los ecosistemas de la región (Freitas y Rocha 2011).

Los datos obtenidos reflejaron una baja respuesta de la actividad MXR (asociada a P-gp) a los disturbios de las cuencas bajo estudio. Debido a esto, no se pudo comprobar de manera definitiva la segunda hipótesis del trabajo que indicaba que las especies que sobreviven en zonas más afectadas por disturbios agropecuarios y expresan el sistema MXR, presentan niveles de actividad más elevados. Sin embargo, en función de estos resultados y de la escasa literatura en relación a éste tipo de disturbio, se buscó comparar la actividad MXR de estos sitios con otros asociados al uso urbano. Dada la presencia de moluscos de la especie *P. acuta* no solo en los sitios de estudio del presente trabajo relacionados con actividades agropecuarias, sino también en zonas

urbanas, se tuvo la posibilidad de evaluar la actividad MXR en estos organismos sometidos a distintos tipos e intensidades de disturbios. Uno de estos sitios, localizado en el arroyo Esquel, se encontraba aguas abajo de la ciudad de Esquel y recibía las descargas de la planta de tratamiento de líquidos cloacales. El otro sitio, ubicado en el mismo arroyo, aguas arriba de la urbanización fue considerado como referencia. Los ensayos mostraron que los organismos presentes en el sitio de referencia acumularon 4 veces más RB que los presentes en los sitios afectados por prácticas agropecuarias, y 7 veces más que los presentes en el sitio afectado por los residuos sólidos de la urbanización. Esto indicaría una mayor capacidad de detoxificación en los organismos del sitio afectado por la contaminación urbana, y una capacidad de detoxificación intermedia en los organismos de los sitios afectados por las prácticas agropecuarias, con respecto al sitio de referencia. Además, el valor R calculado para cada uno de los sitios, indicó que la actividad MXR mediada por P-gp resultó mayor en el sitio afectado por la urbanización en relación al sitio de referencia y a los sitios afectados por prácticas agropecuarias (25% mayor). Experimentos realizados en peces *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoíris) presentes en arroyos urbanos de la región también mostraron aumentos en la actividad MXR mediada por P-gp en sitios post-urbanización (Assef et al. 2019), lo que pareciera indicar que sustancias de origen antrópico que llegan a este curso de agua, podrían ser las responsables de esta modificación en el sistema MXR.

En el mismo sentido distintos trabajos han registrado aumentos tanto en los niveles de proteínas de membrana asociados al sistema de detoxificación MXR, como en la actividad de este mecanismo en diferentes organismos acuáticos presentes en sitios contaminados. Mejillones marinos *Mytilus edulis* provenientes de sitios altamente contaminados con PAH, PCB y DDT mostraron expresiones altas de P-gp en branquias y tejidos del manto, evidenciando el sitio más contaminado, el mayor nivel de expresión de proteínas (Minier et al. 1993). Resultados similares fueron obtenidos por Minier y Moore (1996) al comparar organismos provenientes de sitios contaminados y no contaminados en el sur de Inglaterra. Estudios que evaluaron la actividad de este sistema de detoxificación en *Mytilus galloprovincialis* utilizando ensayos de acumulación detectaron un incremento en la actividad del sistema asociado a un incremento en el nivel de contaminación de los sitios (Kurelec et al. 1996 a).

Otros estudios, sin embargo, han encontrado que la actividad MXR evaluada en *Crassostrea virginica* y *Crassostrea gigas*, no presenta relación con el nivel de contaminación de los sitios (Minier et al. 1993, Minier 1994). Del mismo modo, Damaré et al. (2009) demostraron que este mecanismo no sería un indicador sensible de la exposición a contaminantes en ciertas especies de peces de agua dulce. Esto podría deberse a que también existen factores naturales capaces de influenciar la expresión del fenotipo MXR. Aumentos en la temperatura del sitio de estudio (Chin et al. 1990; Eufemia y Epel 2000; Horak y Assef 2017), así como la presencia de diversas sustancias producidas por bacterias o algas (Toomey et al. 1996; Eufemia et al. 2002) son capaces de modular el sistema MXR. Esto resalta la necesidad de determinar y caracterizar de manera integral la funcionalidad de este mecanismo de defensa contemplando las variaciones ambientales de este tipo a las que pueden estar sujetos los organismos en sus ambientes naturales. Otra opción utilizada por muchos autores es la realización de experimentos *in-vitro* (en condiciones controladas) empleando líneas celulares (Minier et al. 1999).

Los resultados obtenidos indicarían que si bien en estos organismos el sistema MXR presenta actividad en todos los ambientes estudiados, en el sitio afectado por la urbanización, aproximadamente el 48% de esta actividad es producto de la acción de P-gp. En los restantes sitios, en cambio, otras proteínas de la familia ABC como podría ser ABCC y ABCG (Luckenbach y Epel 2008; Pohl et al. 2011; Ferreira et al. 2014; Bieczinski et al. 2014) podrían estar involucradas en gran parte del proceso de detoxificación, tal como lo reflejan los ensayos de bioacumulación. La información obtenida sugiere que el mecanismo MXR presenta potenciales aplicaciones en la evaluación de sitios que presenten un impacto moderado por la presencia de contaminantes de origen urbano (ej. efluentes urbanos no tratados, desechos domésticos y escorrentía urbana) como ocurre frecuentemente en los ambientes de Patagonia. Cabe destacar que la amplia distribución de la especie *P. acuta* y los datos aquí presentados, proporcionan información importante sobre el posible uso del sistema MXR como biomarcador en el monitoreo ambiental.

### *Actividad MXR in vitro*

Se evaluó la capacidad moduladora *in vitro* de la actividad del sistema MXR de compuestos químicos utilizados en las prácticas agropecuarias que se realizan en la región sobre las dos especies utilizadas en los ensayos a campo. Se expusieron moluscos *P. acuta* y *Ch. dombeiana* a concentraciones crecientes del herbicida Glifosato Gleba, el principio activo de este compuesto, y el antiparasitario Bagomectina (contiene ivermectina 1 % como principio activo), durante períodos de 96 y 240 h, (4 días y 10 días, respectivamente). Estos compuestos surgieron como algunos de los más utilizados en la región, según datos aportados por el INTA (E.E.A. Esquel). Transcurridos los períodos de incubación se realizaron ensayos de acumulación de RB en ausencia y presencia de verapamilo. Estos experimentos constituyeron una etapa preliminar en la evaluación del posible efecto inductor del sistema MXR producido por los compuestos antes mencionados. No se evaluaron los posibles efectos de la combinación de estos compuestos ni sus potenciales sinergias.

El glifosato es un herbicida no selectivo de acción sistémica de amplio espectro utilizado para el control de malezas, en tratamientos de post-emergencia al follaje. La gran solubilidad del glifosato en agua hace que pueda ser encontrado frecuentemente en ríos, arroyos y cuerpos de agua que se encuentran próximos a las zonas de aplicación. Trabajos realizados en la región pampeana de nuestro país registraron concentraciones entre 0,1 y 0,56 mg.l<sup>-1</sup> en cursos de agua en momentos no asociados a un evento de aplicación del compuesto en los campos. Además registraron también una vida media del compuesto de entre 45 y 60 días, con una persistencia en el ambiente de hasta 170 días, pudiendo esta ser aún mayor en climas fríos o templados fríos (Peruzzo et al. 2008; CONICET 2009).

Los individuos de *C. dombeiana* expuestos durante 96 h a concentraciones de 100 y 500 µg.l<sup>-1</sup> de glifosato comercial mostraron un menor valor R, es decir, una mayor actividad MXR, que los individuos incubados en condiciones control. A 240 h, por su parte se apreció una disminución de los valores R en prácticamente todas las concentraciones analizadas, en relación al grupo control. Estas disminuciones en los valores R indicarían un aumento de la actividad MXR debida a la acción de P-gp, en la especie *C. dombeiana* a las concentraciones estudiadas. Cabe destacar que esta

tendencia al aumento de la actividad es más notoria en concentraciones inferiores al aumentar el tiempo de exposición. Los niveles de acumulación control no se modificaron para ninguna de las concentraciones, tiempos y formulaciones estudiadas.

Con respecto a los grupos de *C. dombeiana* expuestos a las diferentes concentraciones del principio activo de este formulado comercial, no se observaron diferencias entre los valores R obtenidos para las distintas concentraciones, y el del grupo control. Esto no se vio modificado por el aumento del tiempo de exposición de los individuos. Al comparar los valores obtenidos para los organismos expuestos a ambos compuestos analizados, se pudo apreciar que el glifosato comercial si produciría un aumento de la actividad MXR, para las concentraciones de 100 y 500  $\mu\text{g.l}^{-1}$  (96 h), mientras que el principio activo no lo hizo.

Los experimentos realizados con moluscos de la especie *P. acuta* expuestos a glifosato comercial, mostraron valores R menores al control al ser incubados en concentraciones entre 0,1 y 10  $\mu\text{g.l}^{-1}$  durante períodos de 96 h. Si bien concentraciones mayores correspondientes a 100 y 500  $\mu\text{g.l}^{-1}$  también mostraron en promedio valores R menores al control, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas. En relación a los experimentos en los cuales los organismos fueron expuestos durante 10 días a las distintas concentraciones de glifosato Gleba, también mostraron una disminución del valor R en relación a los organismos incubados en ausencia de este compuesto. Tendencias similares pudieron apreciarse en los resultados obtenidos de los experimentos realizados con el principio activo del glifosato. Si bien presentan valores R menores a los del control, con diferencias significativas en las concentraciones entre 0,1 y 100  $\mu\text{g.l}^{-1}$  en los ensayos de exposición de 96 h, y en las concentraciones de 1 y 500  $\mu\text{g.l}^{-1}$  para los ensayos de 240 h, no pudieron verse diferencias entre la actividad MXR de los organismos expuestos a los diferentes compuestos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, referidos a la actividad MXR evaluada en moluscos nativos y exóticos, expuestos a un formulado comercial que contiene glifosato, y el principio activo, mostraron que en diferentes concentraciones, ambos compuestos son capaces de modular la actividad del sistema MXR en las especies estudiadas. Los valores R inferiores a los obtenidos en condiciones control indicarían un aumento en la cantidad de RB acumulada dentro de los organismos

cuando la P-gp se encuentra inhibida por el verapamilo. Resultados similares han sido hallados en ensayos de actividad MXR realizados en líneas celulares de pez zebra (*Danio rerio*) en donde los autores aprecian un aumento en la acumulación de sustrato fluorescente en presencia del inhibidor tras la exposición de los organismos a glifosato y al compuesto comercial Round up (Moreira et al. 2019). Estos autores proponen que parte del efecto modulador que produce el glifosato sobre este mecanismo de detoxificación se podría deber a que el compuesto presente en el herbicida, al igual que el verapamilo, interrumpe el normal funcionamiento de las proteínas de membrana encargadas de expulsar la RB del interior celular, aumentando así su acumulación intracelular.

Numerosos trabajos han demostrado que los aditivos presentes en los formulados comerciales de muchos pesticidas son responsables, al menos en parte, de diferentes efectos tóxicos sobre los organismos estudiados. Folmar y colaboradores (1979) estudiaron el efecto de un formulado comercial que presentaba glifosato, su principio activo y el surfactante de manera aislada, sobre diferentes organismos acuáticos, y encontraron que la toxicidad del surfactante era similar a la que presentaba el formulado comercial. El principio activo, sin embargo, mostró ser menos tóxico que los dos anteriores, y estos resultados fueron similares a los encontrados por Bringolf y colaboradores (2007), en experimentos realizados en larvas de bivalvos. En relación a esto, en el presente trabajo, se registró una diferencia en la actividad MXR en organismos *C. dombeiana* que fueron expuestos a concentraciones de 100 y 500  $\mu\text{g.l}^{-1}$  de glifosato comercial Gleba que no fue observada en presencia del principio activo. Estudios posteriores evaluando la acción de los coadyuvantes del compuesto comercial utilizado son necesarios para discernir si estos son los responsables del aumento de dicha actividad, o ésta es producto de la acción conjunta de ambas sustancias, el glifosato y los coadyuvantes.

En la provincia de Chubut, el Decreto N° 1540 del año 2016 define como límite aceptable para la protección de la vida acuática una concentración límite de glifosato de 0,23  $\text{mg.l}^{-1}$  en cursos y cuerpos de agua. Como se mostró en el presente trabajo, concentraciones aún menores a esta, en condiciones *in vitro*, pueden generar en principio, un aumento en la actividad del sistema MXR.

Por otra parte, tanto el presente trabajo, como la legislación antes mencionada, no han contemplado el estudio de los efectos del ácido aminometilfosfónico (AMPA), uno de los principales productos de degradación del glifosato en el ambiente y la biota. A la fecha, numerosos trabajos han demostrado que la persistencia de este compuesto en el ambiente es similar, o en algunos casos superior, a la del glifosato, dependiendo por ejemplo del tipo de suelo estudiado, alcanzando períodos de entre 5 y 27 meses (Grunewald et al. 2001; Landry et al. 2005; Simonsen et al. 2008). Asimismo, se sabe que el AMPA puede resultar tóxico para diferentes organismos (Mañas et al. 2009; Bedano 2016; Dominguez et al. 2016; Van Bruggen et al. 2018), lo que hace necesario el estudio del efecto de este compuesto en organismos de la región.

La ivermectina es un endo y ecto antiparasitario ampliamente utilizado en las distintas producciones ganaderas pudiendo ser aplicado mediante inyecciones o como baños tópicos. Este compuesto presenta una vida media corta en aguas superficiales de 3-5 días (Sanderson et al. 2007) debido a que sufre procesos de fotodegradación, y su gran capacidad para adsorberse al suelo y a la materia orgánica hace que pueda persistir asociado al sedimento durante varios meses (Davies et al. 1998). Sin embargo, la contaminación local de ecosistemas acuáticos podría ocurrir por la llegada de los efluentes de los tratamientos tópicos o debido a la excreción directa de los animales dentro de los cuerpos y cursos de agua (Boxall et al. 2004).

Los organismos de la especie *C. dombeiana* que fueron expuestos a concentraciones de  $1 \mu\text{g.l}^{-1}$  de ivermectina comercial durante 96 h presentaron menores valores R que el grupo control, es decir, indicaron una mayor actividad MXR. Una tendencia similar pudo apreciarse transcurridas las 240 h de ensayo para dicha concentración y también para  $0,01 \mu\text{g.l}^{-1}$ , aunque esta diferencia respecto del control no resultó significativa. Con respecto a los organismos de la especie *P. acuta*, se pudo observar una tendencia al aumento de la actividad de este sistema de detoxificación en las concentraciones entre  $0,01$  y  $1 \mu\text{g.l}^{-1}$  (96 h), sin embargo las diferencias entre estos grupos y el control no fueron significativas, al igual que aquellas encontradas en el ensayo de 10 días. Diferentes estudios realizados en ratones y en peces indican que la ivermectina es un modulador del sistema MXR (Lankas et al. 1997; Katharios et al. 2004; Bard y Godbais 2007). Experimentos realizados en garrapatas resistentes a la ivermectina, mostraron que en presencia de un inhibidor de la P-gp, los organismos eran

más sensibles a este antiparasitario, disminuyendo su concentración letal 50, la tasa de oviposición de las hembras y la viabilidad de los huevos (Pohl et al. 2011). Ensayos de actividad MXR (eflujo de fluorescente) realizados por Jordao y colaboradores (2016) en crustáceos mostraron tasas de transporte de sustrato superiores a los de los organismos control en individuos expuestos a concentraciones de 3 y 6 ng.l<sup>-1</sup> de ivermectina 24 h, lo que indicaría una inducción de este sistema debido a la exposición a este fármaco. El aumento de actividad MXR, registrada a partir de los valores R promedio obtenidos en el presente estudio para concentraciones entre 0,01 µg.l<sup>-1</sup> y 1 µg.l<sup>-1</sup> (96 h) son consistentes con los resultados registrados por Jordao y colaboradores y por Lespine et al., (2006). En este último trabajo realizado en líneas celulares humanas registran un aumento en la acumulación de ivermectina dentro de las células en presencia de un inhibidor de P-gp en relación a organismos no expuestos este inhibidor. Esto demuestra la capacidad de esta droga para interactuar con los transportadores de este mecanismo, reduciendo su acción detoxificadora.

Los resultados obtenidos de los ensayos realizados con ivermectina comercial son consistentes con los registrados en bibliografía. Existiría un efecto modulador de este compuesto sobre el sistema MXR, en especial sobre la actividad de la P-gp. Es necesario realizar estudios complementarios para evaluar la acción individual de esta droga, en ausencia de coadyuvantes, sobre la actividad MXR en *C. dombeiana* y *P. acuta*. Es importante destacar que en Chubut no se dispondrían de valores límite para este compuesto en ambientes acuáticos, por lo que hasta el momento no existirían medidas de protección en relación a este fármaco ampliamente utilizado en la región. Más experimentos evaluando la toxicidad de la ivermectina asociada a su persistencia en los sedimentos de ríos y arroyos son necesarios para proponer medidas de protección para estos ecosistemas.

Los ensayos preliminares realizados en el presente trabajo sugieren que la exposición de moluscos *C. dombeiana* y *P. acuta* a glifosato y a ivermectina *in vitro* producen una modulación del sistema MXR. Si bien es necesario aumentar el número de experimentos para mejorar la significancia de los resultados obtenidos, las mayores actividades de este sistema de detoxificación, reflejadas como disminuciones en los valores R en relación al control indicarían un efecto inductor de estos compuestos sobre la expresión de estas proteínas de membrana, en concordancia con la tercer hipótesis

planteada en el presente trabajo. Estos datos avalan el potencial del sistema MXR como biomarcador de calidad del agua en cuencas bajo uso agropecuario. Es importante realizar experimentos que evalúen el efecto combinado de estos y otros compuestos de uso habitual en la región para poder evaluar posibles efectos acumulativos y/o sinérgicos que ya han sido registrados en otros estudios (Dos santos et al., 2014). Por otra parte, el verapamilo utilizado en el presente trabajo, tiene la capacidad de inhibir el mecanismo MXR cuando éste es mediado por P-gp, provocando la acumulación de diferentes compuestos que son sustratos de éstos transportadores, en el interior celular. De forma análoga, los compuestos químicos aquí analizados, u otros presentes en el medio ambiente, ya sean de origen natural o antrópico, también pueden inhibir este sistema de transporte, pudiendo saturarlo y revertir así su normal funcionamiento (Kurelec, 1995). De esta manera, sustancias que normalmente eran expulsadas del interior celular por medio de este mecanismo, quedan atrapadas pudiendo resultar tóxicas, aún en concentraciones en las que antes no lo eran. Estas sustancias que tienen la capacidad de bloquear el normal funcionamiento del sistema MXR se denominan quimiosensibilizantes y pueden alterar potencialmente la toxicidad de otros compuestos en organismos acuáticos, modificando la resistencia natural de los organismos hacia una sensibilidad patobiológica (Smital y Kurelec 1997; Smital et al. 2004). De este modo, la búsqueda de posibles quimiosensibilizantes en los ambientes acuáticos, considerados contaminantes emergentes, surge como una aplicación relevante del sistema MXR, además de su rol como biomarcador en la evaluación ecotoxicológica de ambientes acuáticos (Kurelec et al., 2000).

#### *Efectos de las actividades agropecuarias sobre los ensambles de macroinvertebrados*

Los resultados obtenidos demuestran que la comunidad de macroinvertebrados se vio afectada por las prácticas agropecuarias, particularmente por la cría de ganado en confinamiento. Los incrementos moderados en las concentraciones de nutrientes, sumados al aumento de la exposición solar de los lechos de los arroyos como producto de la disminución de la vegetación de ribera, pueden estimular la producción primaria y en consecuencia, aumentar la densidad de invertebrados y peces (Barbour et al. 1996;

Niyogi et al. 2007). En los sitios de estudio evaluados, se pudo apreciar un aumento en la densidad media de individuos muy marcada entre los sitios I1 e I4, presentando este último la mayor densidad de macroinvertebrados de los 9 sitios estudiados. Resultados similares fueron obtenidos en relación a la riqueza taxonómica registrada. Los sitios asociados a actividades ganaderas en modalidades intensivas presentaron valores de riqueza específica absoluta superiores a los de los sitios de referencia correspondientes en el mismo arroyo ( $R3 > R1$  y  $I4 > I1$ ). Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas en los índices de diversidad de estos sitios, y pudo observarse un predominio de grupos tolerantes, como Annelida y Diptera, en particular en los sitios R3 e I4 durante el período de aguas bajas. Esto indicaría que existe un nivel de degradación moderado producido por el aumento de nutrientes, el cual de incrementarse podría resultar en la eutrofización de estos sitios. Este fenómeno podría conducir al desarrollo de proliferaciones de algas que, en general, restringen la heterogeneidad espacial para los organismos acuáticos presentes (Quinn 2000; Allan 2004).

Por otra parte, aquellas modificaciones que derivan de la presencia de ganado en las riberas, como por ejemplo aumento de los procesos de erosión y sedimentación, pueden actuar como factores de estrés con efectos negativos sobre especies de macroinvertebrados bentónicos sensibles al depósito de partículas inorgánicas finas como arena o limo. Entre estos efectos se han incluido: la pérdida de hábitat o refugio adecuados, el enterramiento de comunidades bióticas bajo los sedimentos, la abrasión de estructuras anatómicas de organismos (por ej. branquias externas) (Song et al. 2009; Velásquez y Miserendino 2003; Miserendino et al. 2012). Algunas especies sensibles o intolerantes a la sedimentación, resultaron eliminadas durante el período de aguas bajas, en sitios ubicados en el arroyo Ruca e Ingram asociados a ganadería intensiva (R3, I4). Este patrón fue particularmente notorio en el arroyo Ingram, en donde la riqueza y abundancia de los grupos EPT se vio reducida hasta en un 50 % entre los sitios I1 e I4, y donde el grupo Plecoptera resultó prácticamente extirpado de la comunidad. Estos resultados indicaron procesos de degradación aún mayores que los identificados por Brand y Miserendino (2015) en sitios afectados por ganadería extensiva, en donde se documentó una disminución del 20 % en la riqueza EPT y una pérdida del 43 % del ensamble de Plecoptera. De manera similar a otros trabajos, se ha encontrado que especies de Ephemeroptera, Plecoptera y Trichoptera resultaron útiles para detectar

modificaciones derivadas de las prácticas ganaderas en diferentes modalidades (Sutherland et al. 2012; Brand y Miserendino 2015; Goss et al. 2014). Como anticiparan Velázquez y Miserendino (2003), en los arroyos patagónicos los síntomas de la sedimentación serían rápidamente evidenciados en la estructura y composición de las comunidades de macroinvertebrados bentónicas.

En estos sitios afectados por prácticas ganaderas se pudo apreciar también un aumento de los taxones tolerantes a los sedimentos y a los procesos de eutrofización, como *Lumbriculus variegatus*, *Pristina* sp. o *Nadidae* spp. Esto es similar a lo registrado por Shilla y Shilla (2011) y Niyogi y colaboradores (2007) en ambientes asociados al pastoreo. Asimismo, sitios afectados por prácticas agrícolas y desarrollos urbanos, donde además el ingreso de nutrientes en los cursos de agua es significativo (Rodríguez Capítulo et al. 2001; Miserendino et al. 2008), resultó en un aumento de la densidad de organismos tolerantes. De esta manera, las modificaciones encontradas en los ensambles de macroinvertebrados bentónicos de los distintos sitios, coinciden con lo propuesto en la cuarta hipótesis del presente trabajo: la degradación de la calidad del agua y las modificaciones del hábitat, producto de las actividades agropecuarias, resultaron en cambios en la comunidad de macroinvertebrados bentónicos.

Los principales cambios registrados por los indicadores de condición de hábitat y de la calidad del ecosistema de ribera, ayudaron a interpretar cómo las modificaciones que se producen en las adyacencias de los arroyos, asociadas al uso de la tierra, pueden modificar fuertemente sus condiciones ecológicas (Miserendino et al. 2011). Estos resultados son especialmente relevantes dado que la estructura de la comunidad de macroinvertebrados en ríos de montaña depende en gran medida de los recursos alóctonos provenientes de las áreas boscosas de la ribera (Piscart et al. 2009; Arnaiz et al. 2011). El presente estudio señaló que la abundancia relativa del grupo funcional fragmentadores disminuyó tanto en el arroyo Enna como en el Ingram, en coincidencia con un empobrecimiento en las condiciones ribereñas (zona buffer) y del hábitat en los arroyos. Goss y colaboradores (2014) también reportaron cambios importantes y rápidos en la abundancia de fragmentadores asociados con la modificación de los atributos del bosque ribereño.

La contribución relativa del grupo colectores-recolectores aumentó en la mayoría de los sitios impactados por prácticas agropecuarias, en los cuales la zona de amortiguación ribereña estaba fuertemente (R3, I4) o moderadamente alterada (E2, R2). Además, se apreció una disminución en la abundancia relativa del grupo funcional raspadores. Esto podría deberse al empobrecimiento en la calidad y cantidad del alimento probablemente como consecuencia de una mayor deposición de sedimentos finos en el lecho de los arroyos. Esto podría interferir tanto en el acceso de los organismos al perifiton como en la calidad de los biofilms (Peeters et al. 2006; Sutherland et al. 2012). Los resultados obtenidos, son consistentes con los encontrados por Brand y Miserendino (2015) en sitios asociados a ganadería extensiva en la región Patagónica, lo cual indicaría que independientemente del nivel de disturbio generado por estas prácticas en relación a los cursos de agua, estas producen modificaciones apreciables en la estructura trófica de las comunidades de macroinvertebrados.

Las respuestas de los macroinvertebrados a los disturbios ambientales introducidos por las prácticas agropecuarias estudiadas fueron consistentes en términos de composición dado que se encontraron asociaciones de especies en los sitios de referencia que fueron diferentes de los ensambles de los sitios afectados por dichas prácticas. Este tipo de respuestas comunitarias han sido documentadas en arroyos y ríos que atraviesan desarrollos agrícolas y ganaderos en distintas regiones (Hodkinson y Jackson 2005; Litvan et al. 2008; Song et al. 2009).

Los análisis de correspondencias canónicas (ACC) generaron un ordenamiento que indicaron por un lado, un gradiente de disturbio, asociado a la conductividad, carga bacteriana y concentración de clorofila *a*, y a la concentración de oxígeno disuelto y la velocidad del agua. Por otro lado, el ordenamiento también indicó una relación entre el TSS, el PR5 y el  $\text{NH}_4^+$ , variables asociadas a la presencia de ganado en los sitios de estudio. Al relacionar este ordenamiento con los ensambles de macroinvertebrados, se documentó que especies sensibles o intolerantes mostraron altas densidades en los sitios bien oxigenados y con gran caudal. Las especies del grupo EPT como *Metamonius anceps*, *Antarctoperla michaelsoni*, *Monocosmoecus* sp., *Udamocercia arumifera*, *Rheochorema* sp., *Nousia bella* mostraron preferencias por estas condiciones ecológicas reforzando su rol como bioindicadores de buena calidad del agua. Esto se debe a que la

mayoría de los que componen el grupo de especies son endémicas y que además tienen requisitos ecológicos estrictos (Miserendino et al. 2008; 2011)

Por el contrario, taxones tolerantes como Tubificidae, *Biomphalaria* sp., *Pseudochironomus* sp., *Parachironomus* sp. y Ephydriidae sp. mostraron preferencia por sitios con valores altos de conductividad, altas cargas bacterianas y niveles altos de clorofila *a*. Otros taxones tolerantes a altas concentraciones de nutrientes fueron *Orthocladus* sp1, Ostracoda sp., Thaumaleidae sp., y Nadidae. En general estos grupos faunísticos estarían asociados a ambientes afectados por distintos tipos de disturbios antropogénicos (Herbst et al. 2012; Rasmussen et al. 2013; Brand y Miserendino 2015), y cursos de agua que muestran síntomas de erosión y sedimentación (Sutherland et al. 2012; Merchán et al. 2018).

Los patrones de distribución de especies encontrados en este trabajo, probablemente puedan ser explicados tanto por causas naturales como antrópicas. Si bien los desarrollos agropecuarios estudiados, mostraron cursos de agua ecológicamente degradados (como lo indican los aumentos de conductividad y nutrientes, la disminución del oxígeno disuelto y un mayor recuento de bacterias *E. coli*) (Bragina et al. 2017; Merchán et al. 2018), la desconexión de flujo de agua que se produce en el arroyo Ingram (intermitencia natural) probablemente haya desmejorado las condiciones ambientales, resultando en una comunidad bentónica simplificada en términos de especies presentes (Wooster y Deban 2018).

Tal como se esperaba, se obtuvieron varias correlaciones significativas entre métricas de macroinvertebrados y variables ambientales relacionadas a la calidad de agua, tales como la concentración de amonio, la conductividad y el número de bacterias fecales. Se registró un alto número de correlaciones negativas significativas entre las medidas de riqueza y la concentración de amonio en el agua. Trabajos realizados a escala de micro y mesocosmo han demostrado que concentraciones de amonio incluidas en el rango registrado en el presente trabajo, resultan tóxicas para especies de anfipodos y del grupo EPT (Hickey et al. 1999; Berenzen et al. 2001). En consonancia con esto, modelos lineales generalizados construidos a partir de métricos de macroinvertebrados y parámetros de calidad del agua indicaron relaciones negativas entre la concentración de amonio presente en el curso de agua y la riqueza de EPT y el número de familias de

insectos, y esto es similar a lo registrado por Hooda y colaboradores (2000). En este sentido, las métricas mencionadas pueden ser utilizadas como centinelas para generar alertas tempranas del impacto que pueden generar los cambios en el uso de la tierra. Un aspecto importante es que ambas métricas están basadas en datos cualitativos, cuya obtención implica menos esfuerzo que el uso de métricas cuantitativas, y aún así resultan muy informativas acerca de las condiciones ecológicas predominantes en los arroyos.

### *Prácticas de manejo para reducir el impacto de la ganadería*

El acceso irrestricto del ganado a los cursos de agua y sus riberas no solo genera aportes de nutrientes y diversas sustancias potencialmente tóxicas a los ambientes acuáticos, sino que también conduce a procesos de homogeneización de los ecosistemas, ya sea por aumentos en los procesos de erosión y sedimentación, por disminución de la vegetación de la ribera, entre otros. Esta consecuente disminución de la heterogeneidad ambiental, conduce no solo a la pérdida de la biodiversidad, sino que en conjunto, llevan a la progresiva pérdida de la resiliencia de los ecosistemas acuáticos (Cingolani et al. 2008; Mesa et al. 2015; Hughes 2016). Es por esto que las prácticas o manejos tendientes a reducir la degradación de los ambientes dulceacuícolas no solo deben estar apuntadas a disminuir la llegada de sustancias al agua, sino también a favorecer una mayor heterogeneidad ambiental, protegiendo así la integridad ecológica y la calidad de los servicios ecosistémicos que estos proveen (Wen et al. 2016; Graeber et al. 2017).

A pesar de que muchos de los sitios estudiados no presentaron prácticas de mitigación para proteger los cursos de agua, se pudieron identificar algunas acciones específicas en las riberas que presentaron sistemas de cría de ganado en confinamiento que podrían ayudar a disminuir el disturbio producido. La deposición intencional de grava y ripio en áreas específicas de las riberas y los arroyos (áreas mallinosas), con el propósito de evitar las lesiones en el ganado, podrían colaborar a disminuir las tasas de erosión, minimizando así la turbidez y la deposición de sedimentos (Schueler y Brown 2004). Esta acción puede limitar la pérdida potencial de suelo y el subsecuente

transporte de partículas y materiales hacia el lecho del río (Magner et al. 2008; García et al. 2015).

Existen otras prácticas de manejo que están siendo puestas a prueba en distintos lugares del mundo con buenos resultados. Muchos autores coinciden en que aquellas estrategias que disminuyen el tiempo de permanencia de los animales en el curso de agua y sus riberas, son beneficiosas para reducir el nivel de disturbio generado (Hughes 2016; Malan et al. 2018). En este sentido, si bien la implementación de sistemas de aprovisionamiento de agua, fuera de las riberas, reduce el número de visitas de los animales a los cursos de agua, esto no resulta suficiente para producir cambios significativos en los procesos de erosión y sedimentación (Line 2003; Miller et al. 2010). Es por esto que diversos autores sugieren la implementación conjunta de estos dispositivos con sistemas que permitan excluir a los animales de las riberas (alambrados, cercas eléctricadas) (Hughes 2016). Los resultados del presente trabajo mostraron que la integridad de la ribera fue mejor en aquellos sitios en los cuales el ganado se encontró excluido, en consonancia el índice QBRp mostró valores más altos, sugiriendo un buen nivel de conservación. Puede apreciarse que en el corto plazo, la ausencia de ganado en las riberas conduce a una recuperación paulatina de la vegetación (Miller et al. 2010 a y b; Oles et al. 2017; Odadi et al. 2017), incrementando la capacidad de las mismas de retener no solo sedimentos (Hicks 1992; Boothroyd et al. 2004), sino también los nutrientes y las bacterias generalmente asociadas a esta actividad (Schwarte et al. 2011; Wilcock et al. 2013).

Con respecto a la recuperación de la vegetación de las riberas distintos estudios han abordado el efecto de diferentes técnicas de restauración en espacios que han sido sometidos a actividad ganadera durante largos períodos de tiempo. Si bien estos estudios no han encontrado cambios significativos en las propiedades del suelo durante el período de estudio (8-10 años), si registraron una disminución importante del porcentaje de suelo desnudo y un incremento en la cobertura y ancho de la vegetación ribereña (Hale et al. 2018). Además, el desarrollo de estrategias de restauración activa (ej. siembra de especies nativas o plantación de renovales) en sitios previamente disturbados, mostraron mejores resultados que aquellos sitios en los que solo se aplicaron técnicas de exclusión del ganado que eliminaba el forrajeo de las riberas (Higginson et al. 2019). Estas mejoras en la calidad de la ribera, reflejan además efectos

positivos en la calidad del agua de los arroyos asociados, en términos de disminución de la turbidez y los procesos de sedimentación e incrementos del oxígeno disuelto y el aporte de materia orgánica (Collins et al. 2013). Si bien los efectos de los procesos de restauración de las riberas no son observables en el corto plazo, existe evidencia suficiente de los múltiples beneficios que produce la recuperación de estos ambientes (Giorgi 2014; Feld et al. 2018).

Por otra parte, una estrategia poco costosa y ambientalmente sustentable para minimizar la llegada de contaminantes producidos por la actividad ganadera a los cuerpos de agua es el tratamiento efluentes mediante la fitorremediación, utilizando plantas acuáticas (Rizzo et al. 2012). Diversos trabajos han demostrado que acciones de este tipo son efectivas para disminuir la concentración de compuestos nitrogenados en los cuerpos de agua (Loe et al. 2018), y para disminuir la demanda química de oxígeno de los sistemas (Mendieta-Pino et al. 2019). De esta manera, los sistemas de fitorremediación podrían constituir una alternativa para reducir la eutrofización y los efectos tóxicos producidos por los desechos, los cuales alteran a la biota acuática (Wilcock et al. 2013).

Debido a la alta conectividad que existe entre los cursos de agua y sus riberas, cualquier estrategia que sea aplicada con el fin de prevenir la degradación de estos ambientes se verá reflejada como un incremento en la calidad de los ecosistemas acuáticos (Hughes 2016). Es por esto que debería fomentarse la implementación de prácticas de manejo tendientes a proteger los ambientes de ribera que constituyen una zona de amortiguación muy importante para dichos ecosistemas. De esta manera se podrían reducir los procesos de degradación a los que se ven sometidos estos ambientes, protegiendo su integridad, y garantizando la calidad de los servicios ecosistémicos provistos.



# **CONCLUSIONES**

## 6. CONCLUSIONES

La calidad del agua de los arroyos estudiados, afectados por diferentes actividades agropecuarias se vio empobrecida, debido al aporte de nutrientes, sedimentos y patógenos a los arroyos, así como por la degradación de la calidad del hábitat y el ecosistema ribereño. Las variables físicas y químicas del agua revelaron un deterioro general en los sitios asociados a la cría de ganado en confinamiento, así como un aumento en las concentraciones de nutrientes, que también se produjo en los sitios asociados a producciones hortícolas. La presencia de ganado en las riberas produjo una disminución de la cobertura vegetal (por herbivoría) y un aumento en la concentración de sedimentos en los arroyos, que condujeron a una pérdida de diversidad de ambientes disponibles para la biota acuática. Si bien estos disturbios resultaron moderados en relación a aquellos registrados en sitios afectados por urbanizaciones en la región, los macroinvertebrados bentónicos respondieron al mismo con cambios de composición y estructura comunitaria.

La actividad MXR evaluada en moluscos dulceacuícolas *Chilina dombeiana* y *Physa acuta* presentes en los sitios de estudio, mostró una baja respuesta a los disturbios allí registrados. Sin embargo al comparar esta actividad en organismos de la especie *Physa acuta* provenientes de sitios de referencia y en un sitio afectado por desechos urbanos (externos a los del presente trabajo), sí pudo apreciarse una respuesta diferencial, con mayor actividad en los organismos presentes en este último sitio mencionado. Además se pudo comprobar que sustancias utilizadas actualmente en la región, asociadas a la agricultura y la ganadería, como el glifosato y la ivermectina, producen una inducción de este sistema de detoxificación en condiciones *in vitro*. Es por esto que, de incrementarse el nivel de disturbio, o la llegada de estas u otras sustancias a los cursos de agua, este biomarcador podría resultar de utilidad para generar alertas tempranas de cambios que puedan resultar riesgosos para la biota del lugar.

Se encontraron también respuestas consistentes en la composición y estructura funcional de los ensambles de macroinvertebrados bentónicos con respecto a los usos de la tierra evaluados. En los sitios en los que se desarrollaban actividades ganaderas intensivas se pudo apreciar una disminución del número de especies de los grupos de macroinvertebrados sensibles (Plecoptera) y un aumento de los grupos más tolerantes

(Annelida y Diptera). Además, los atributos de los ensamblajes se correlacionaron con los factores ambientales que resultaron relevantes como producto de los procesos de degradación (nutrientes, conductividad, sedimentación, bacterias coliformes y clorofila *a*). En el presente trabajo se encontró que las métricas de riqueza de EPT y el número de familias de insectos pueden ser usadas como centinelas en el monitoreo de los sitios afectados por el uso agropecuario. Un aspecto relevante de estas métricas es que ambas se basan en datos cualitativos, lo que significa que, con menos esfuerzo que el que demanda la obtención de métricas cuantitativas, proporcionan información útil sobre las condiciones ecológicas predominantes en los arroyos.

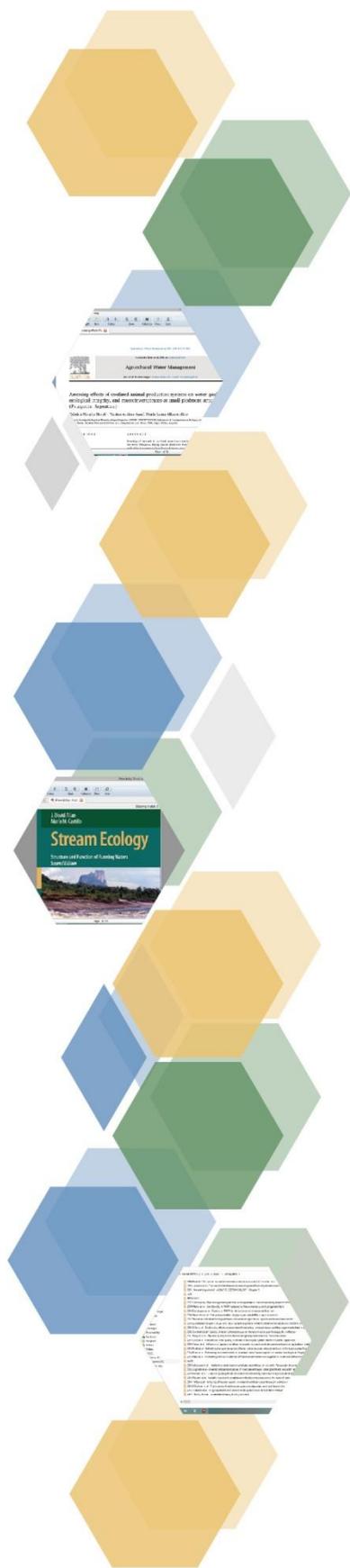
Con el fin de valorar el impacto que las actividades antrópicas tienen sobre los ecosistemas acuáticos, resulta de gran importancia desarrollar metodologías que permitan evaluar el estado de estos sistemas y seguir los cambios que allí ocurren, a lo largo del espacio y el tiempo. El registro de las modificaciones físico químicas que se producen en un sitio por el efecto de la actividad humana, brinda información útil sobre la calidad del agua y son los parámetros generalmente utilizados para determinar regulaciones o valores guía. Sin embargo, en muchos casos, modificaciones leves de estos parámetros, así como la aparición de sustancias difíciles de medir (ej. pesticidas, fármacos), resultan en respuestas significativas en los organismos que habitan estos ambientes. Es por esto que, el uso de biomonitores, a diferentes niveles de organización, resulta importante para generar alertas tempranas sobre los disturbios que el hombre genera y que pueden poner en riesgo al ecosistema evaluado, y los servicios que este brinda.

Las evaluaciones de biomarcadores realizadas en el trabajo, mostraron que si bien la actividad MXR (mediada por Pg-p), no resultó sensible al nivel de disturbio encontrado, sí mostró respuestas a la presencia *in-vitro* de sustancias que se utilizan en prácticas agropecuarias de la región. Esto indicaría que, de llegar estas sustancias a los cursos de agua, o de aumentar su concentración, este biomarcador podría resultar un indicador útil de procesos de contaminación. La respuesta de los bioindicadores estudiados, a nivel de comunidad (ensamblajes de macroinvertebrados bentónicos) indicó que los sitios investigados presentaron disturbios moderados, que derivaron de las actividades agropecuarias que allí se desarrollan. Esto muestra que existen procesos de degradación en marcha que afectan la calidad del agua de los arroyos. Puede verse así

que las diferentes metodologías de biomonitorio, evaluando respuestas producidas a distintos niveles de organización biológica, contribuyen a obtener diagnósticos más completos sobre el estado de los ecosistemas y en consecuencia, de la integridad ecológica de los mismos.

En los sitios de estudio y si bien mostraron algún nivel de efectividad, se observaron pocas estrategias de mitigación tendientes a proteger la calidad del agua de los arroyos y sus riberas (enripiado, exclusión del ganado). Aunque los disturbios producidos por las prácticas agropecuarias observadas resultaron moderados, es esperable que la continuidad de estas en el tiempo, así como su diversificación e intensificación resulten en disturbios aún mayores y difíciles de remediar. Sería oportuno fomentar el uso de medidas de mitigación y conservación, dirigidas al mantenimiento de la integridad de los corredores ribereños, como la exclusión del ganado y la reforestación de riberas. Esto disminuiría los pulsos o síntomas de sedimentación producidos por el pisoteo, amortiguaría los aportes de nutrientes y reduciría los niveles de bacterias. Asimismo, el uso de estanques de mitigación de efluentes o humedales artificiales podría ser una alternativa factible para el tratamiento de los residuos producidos por el ganado en confinamiento.

La recuperación completa de los ecosistemas lóticos ya afectados por prácticas de este tipo es dificultosa y poco probable. Sin embargo, existe evidencia suficiente de que las actividades tendientes a mejorar la calidad de los ecosistemas de ribera así como la eliminación del ganado de los cursos de agua ayudan a mejorar y mantener el buen funcionamiento de los arroyos y su biodiversidad. Esto indica que el esfuerzo que se aplique en la restauración de las riberas producirá mejoras significativas en la calidad del agua y los servicios ecosistémicos que estos ambientes brindan, garantizando así su uso prolongado en el tiempo. Los ambientes dulceacuícolas en el noroeste de Patagonia sostienen entre otras múltiples actividades involucradas en el turismo y la recreación (observación de aves, natación, canotaje, pesca deportiva, etc.) las que también son opciones válidas para el dinamizar la economía regional. En consecuencia, el mantenimiento de la calidad del agua y de la integridad de estos arroyos evitaría potenciales conflictos con los usuarios de estos recursos naturales.



# BIBLIOGRAFÍA

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, S.M., Greeley, M.S., 2000. Ecotoxicological Indicators of Water Quality: Using Multi-Response Indicators to Assess the Health of Aquatic Ecosystems. *Water Air Soil Pollut.* 123, 103–115. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-4369-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-94-011-4369-1_10)
- Albariño, R., Venturino, A., Montagna, C. M., Pechen de D'Angelo, A. M. 2007. Environmental effect assessment of Magnacide H herbicide at Río Colorado irrigation channels (Argentina). Tier 4: in situ survey on benthic invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(1), 183–189.
- Albertoli, S., 2016. Investigación de la potencialidad económica y agroalimentaria del Valle Inferior del Río Chubut. INTA - UNPSJB 1–43.
- Allan JD, 1995. *Stream ecology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 400 pp
- Allan, J.D., Castillo, M.M., 2007. *Stream ecology: structure and function of running waters*, Ecology. doi:10.2307/2265800
- Arelovich, H.M., Bravo, R.D., Martínez, M.F., 2011. Development, characteristics, and trends for beef cattle production in Argentina. *Anim. Front.* 1, 37–45. doi:10.2527/af.2011-0021
- Arnaiz, O.L., Wilson, A.L., Watts, R.J., Stevens, M.M., 2011. Influence of riparian condition on aquatic macroinvertebrate communities in an agricultural catchment in south-eastern Australia. *Ecol. Res.* 26, 123–131. <https://doi.org/10.1007/s11284-010-0767-2>
- Assef, Y. A. 2009. Imanitib resistance in multidrug-resistant K562 human leukemic cells. *Leukemic Research*, 33, 706–710.
- Assef, Y. A., Horak, C. N., Boquet, M. G. 2014. Characterisation of the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in the freshwater snail *Physa acuta* from Patagonia (Argentina). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 48, 86–96. doi:10.1080/00288330.2013.846921
- Assef, Y. A., Miserendino, M. L., Horak, C. N. 2014. The Multixenobiotic Resistance Mechanism in Species of Invertebrates Associated to an Urban Stream in the Patagonia Mountain. *Water Air Soil Pollut.* 225, 2164–2177. doi:10.1007/s10745-006-9094-1
- Assef, Y.A., Di Prinzi, C.Y., Horak, C.N., 2018. Differential activities of the multixenobiotic resistance mechanism in freshwater fishes inhabiting environments of Patagonia Argentina. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 217, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.11.019>
- AWWA (American Water Works Association), APHA (American Public Health Association), WEF (Water Environment Federation), 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th Edition, Part 9000. Microbiological examination.
- Bain, L. J., LeBlanc, G. A. 1996. Interaction of structurally diverse pesticides with the human MDR1 gene product P-glycoprotein. *Toxicology and applied pharmacology*, 141(1), 288–298. doi:10.1006/taap.1996.0286
- Barbour, M. T., Gerritsen J., Snyder B. D., Stribling, J. B., 1999. *Rapid Bioassessment Protocols for Use in Streams and Wadeable Rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish*. Second Edition. EPA/841-B-99-002. U.S. EPA, Office of Water, Washington, D.C. 197 pp. plus appendices.
- Barbour, M.T., Stribling, J.B., Verdonschot, P.F.M., 2006. The multihabitat approach of USEPA's rapid bioassessment protocols: Benthic macroinvertebrates. *Limnetica* 25, 839–850.
- Bard, S. M. 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 48(4), 357–389. doi:10.1016/S0166-445X(00)00088-6
- Bard, S.M., Gadbois, S., 2007. Assessing neuroprotective P-glycoprotein activity at the blood-brain barrier in killifish (*Fundulus heteroclitus*) using behavioural profiles. *Mar. Environ. Res.* 64, 679–682. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2007.05.001>

- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S, 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J Stat Softw* 67:1–48. doi:10.18637/jss.v067.i01.
- Bauer, D. E., Donadelli, J., Gómez, N., Licursi, M., Ocón, C., Paggi, A. C., et al. 2002. Ecological status of the Pampean plain streams and rivers (Argentina). *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, 28, 259–262
- Becerra J, Antayhua M, C.C., 2017. Plan Ganadero de la Provincia de Chubut. 2017-2021. Ministerio de la producción. Gobierno de la Provincia de Chubut. Argentina. 67pp.
- Berzen, N., Schulz, R., Liess, M., 2001. Effects of chronic ammonium and nitrite contamination on the macroinvertebrate community in running water microcosms. *Water Res.* 35, 3478–3482. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00055-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00055-0)
- Bialk-Bielińska, A., Stolte, S., Matzke, M., Fabiańska, A., Maszkowska, J., Kołodziejka, M., Liberek, B., Stepnowski, P., Kumirska, J., 2012. Hydrolysis of sulphonamides in aqueous solutions. *J. Hazard. Mater.* 221-222, 264–274. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.044>
- Bieczynski, F., De Anna, J., Pirez, M., Brena, B., Villanueva, S., Luquet, C.M., 2014. Cellular transport of microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) across the intestinal wall: possible involvement of multidrug resistance-associated proteins. *Aquat. Toxicol.* 154, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.05.003>.
- Bieczynski, F., Torres, W.D., Paineñfilu, J.C., Castro, J.M., Bianchi, V.A., Frontera, J.L., Paz, D.A., González, C., Martín, A., Villanueva, S.S., Luquet, C.M., 2016. Alterations in the intestine of Patagonian silverside (*Odontesthes hatcheri*) exposed to microcystin-LR: changes in the glycosylation pattern of the intestinal wall and inhibition of multidrug resistance proteins efflux activity. *Aquat. Toxicol.* 178, 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.07.016>.
- Bobadilla, S., Lexow, G. 2012. Ensayo de forrajeras en el Valle 16 de Octubre, Chubut, 89–96.
- Bodin, N., Burgeot, T., Stanisière, J.Y., Bocquené, G., Menard, D., Minier, C., Boutet, I., Amat, A., Cherel, Y., Budzinski, H., 2004. Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 138, 411–427. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.04.009>
- Boothroyd IKG, Quinn JM, Langer ER, Costley KJ, Steward G. 2004. Riparian buffers mitigate effects of pine plantation logging on New Zealand streams: 1. Riparian vegetation structure, stream geomorphology and periphyton. *For Ecology Manage.* 194:199–213.
- Bossio, D., Geheb, K., Critchley, W., 2010. Managing water by managing land: Addressing land degradation to improve water productivity and rural livelihoods. *Agric. Water Manag.* 97, 536–542. doi:10.1016/j.agwat.2008.12.001
- Boxall, A. B. A. 2004. The environmental side effects of medication. *EMBO reports*, 5(12), 1110–1116. doi:10.1038/sj.embor.7400307
- Boxall, A., Kolpin, D., Holling-sorensen, B. 2003. Are Veterinary Medicines Causing Environmental Risks?
- Bragina, L., Sherlock, O., van Rossum, A.J., Jennings, E., 2017. Cattle exclusion using fencing reduces *Escherichia coli* (*E. coli*) level in stream sediment reservoirs in northeast Ireland. *Agric. Ecosyst. Environ.* 239, 349–358. doi:10.1016/j.agee.2017.01.021
- Brand, C., Miserendino, M.L., 2015. Testing the Performance of Macroinvertebrate Metrics as Indicators of Changes in Biodiversity after Pasture Conversion in Patagonian Mountain Streams. *Water. Air. Soil Pollut.* 226. doi:10.1007/s11270-015-2633-x

- Brand, C., Miserendino, M.L., Epele, L.B., 2012. Spatial and Temporal Pattern of Caddisfly Distribution at a Mesohabitat Scale in two Patagonian Mountain Streams Subjected to Pastoral Use. *Int. Rev. Hydrobiol.* 97, 83–99. doi:10.1002/iroh.201111368
- Bringolf, R.B., Cope, W.G., Mosher, S., Barnhart, M.C., Shea, D., 2007. Acute and chronic toxicity of glyphosate compounds to glochidia and juveniles of *Lampsilis siliquoidea* (Unionidae). *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 2094–2100.
- Burger, J. 2006. Bioindicators: types, development and use in ecological assessment and research. *Environmental Bioindicators*, 1, 22–39.
- Cardinale, B.J., Palmer, M.A., Collins, S.L., 2002. Species diversity enhances ecosystem functioning through interspecific facilitation. *Nature* 415, 426–429. <https://doi.org/10.1038/415426a>
- Castela J, Ferreira V, Graca M., 2008. Evaluation of stream ecological integrity using litter decomposition and benthic invertebrates. *Environ Pollut* 153:440–449. doi:10.1016/j.envpol.2007.08.005
- Chapman, D., 1996. *Water Quality Assessments - A guide to Use of Biota, Sediments an Water in Environmental Monitoring - Second Edition*. London.
- Chessman, B. C. 1995. Rapid assessment of rivers using macroinvertebrates: A procedure base don hábitat-specific sampling, familia level identification and a biotic index. *Australian Journal of Ecology*, 20, 122–129.
- Chin, K. V, Tanaka, S., Darlington, G., Pastan, I., Gottesman, M. M. 1990. Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*, 265(1), 221–226.
- Collins, R., Rutherford, K., 2004. Modelling bacterial water quality in streams draining pastoral land. *Water Res.* 38, 700–712.
- Corigliano M.C. 1999. Índices bióticos: aplicaciones y alcances. *Rev Soc Entomol Argentina* 58: 193–201
- Coronato, F.R., del Valle H.F., 1988. Caracterización hídrica de las cuencas hidrograficas de la provincia del Chubut. *Publicación Técnica, Cenpat-Conicet, Chubut, Puerto Madryn*, pp. 184
- Correa, M. N. 1978. *Flora patagónica, tomo VIII, parte III: Gramineae*.
- Correa, M. N. 1999. *Flora patagónica, tomo VIII, parte IV: Dicotiledóneas Gamopétalas (Ericaceae a Calyceraceae)*.
- Cortelezzi, A., Sierra, M.V., Gómez, N., Marinelli, C., Rodrigues Capítulo, A., 2013. Macrophytes, epipelic biofilm, and invertebrates as biotic indicators of physical habitat degradation of lowland streams (Argentina). *Environ. Monit. Assess.* 185, 5801–5815. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2985-2>
- Cronk, J.K., Fennessy, M.S., 2001. *Wetland Plants: Biology and Ecology*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- D'Ambrosio, J.L., Williams, L.R., Williams, M.G., Witter, J.D., Ward, A.D., 2014. Geomorphology, habitat and spatial location influences on fish and Macroinvertebrate communities in modified channels of an agriculturally-dominated watershed in Ohio, USA. *Ecol. Eng.* 68, 32-46. doi: 10.1016/j.ecoleng.2014.03.037
- Dalla Bona, M., Di Leva, V., De Liguoro, M. 2014. The sensitivity of *Daphnia magna* and *Daphnia curvirostris* to 10 veterinary antibacterials and to some of their binary mixtures. *Chemosphere*, 115, 67–74. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.02.003
- Damaré, C. L., Kaddoumi, A. K., Baer, K. N. 2009. Investigation of the multixenobiotic resistance mechanism in the freshwater fishes western Mosquitofish, *gambusia affinis*, and bluegill sunfish, *lepomis macrochirus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83(5), 640–643. doi:10.1007/s00128-009-9846-x

- Davies IM, Gillibrand PA, McHenry JG, Rae GH (1998) Environmental risk of ivermectin to sediment dwelling organisms. *Aquaculture* 163:29–46
- Davies-Colley, R.J., Nagels, J.W., Smith, R.A., Young, R.G., Phillips, C.J., 2004. Water quality impact of a dairy cow herd crossing a stream. *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* 38, 569–576. doi:10.1080/00288330.2004.9517262
- De Liguoro, M., Di Leva, V., Gallina, G., Faccio, E., Pinto, G., Pollio, A. 2010. Evaluation of the aquatic toxicity of two veterinary sulfonamides using five test organisms. *Chemosphere*, 81(6), 788–793. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.07.003
- Declerck, S., De Bie, T., Ercken, D., Hampel, H., Schrijvers, S., Van Wichelen, J., Gillard, V., Mandiki, R., Losson, B., Bauwens, D., Keijers, S., Vyverman, W., Goddeeris, B., De meester, L., Brendonck, L., Martens, K., 2006. Ecological characteristics of small farmland ponds: Associations with land use practices at multiple spatial scales. *Biol. Conserv.* 131, 523–532. doi:10.1016/j.biocon.2006.02.024
- del Valle H.F., Elissalde N.O., Gagliardini D.A., Milovich J., 1998. Status of desertification in the Patagonian region: assessment and mapping from satellite imagery. *Arid Soil Res Rehab*; 12: 1–27.
- Demetrio, P. M. 2012. Estudio de efectos biológicos de plaguicidas utilizados en cultivos de soja RR y evaluación de impactos adversos en ambientes acuáticos de agroecosistemas de la región pampeana.
- Di Marzio, W. D., Sáenz, M. E., Alberdi, J. L., Fortunato, N., Cappello, V., Montivero, C., Ambrini, G. 2010. Environmental impact of insecticides applied on biotech soybean crops in relation to the distance from aquatic ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(9), 1907–1917. doi:10.1002/etc.246
- Dodds, W.K., Oakes, R.M., 2006. Controls on nutrients across a prairie stream watershed: Land use and riparian cover effects. *Environ. Manage.* 37, 634–646. doi:10.1007/s00267-004-0072-3
- Domínguez, A., Brown, G.G., Sautter, K.D., De Oliveira, C.M.R., De Vasconcelos, E.C., Niva, C.C., Bartz, M.L.C., Bedano, J.C., 2016. Toxicity of AMPA to the earthworm *Eisenia andrei* Bouché, 1972 in tropical artificial soil. *Sci. Rep.* 6, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep19731>
- Dominguez, E., Fernández, H. R. 1998. Calidad de los ríos de la cuenca del Salí (Tucumán Argentina) medida por un índice biótico. In *Serie conservación de la naturaleza. Tomo II. Fundación Miguel Lillo Tucumán. Universidad Nacional de Tucumán.*
- Domínguez, E., Fernández, H., 2009. *Macroinvertebrados bentónicos sudamericanos*, Fundación Miguel Lillo.
- Dos Santos, K. C., Martínez, C. B. R. 2014. Genotoxic and biochemical effects of atrazine and Roundup(R), alone and in combination, on the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 100(1), 7–14. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.11.014
- DPN°/2006 Pcia de Chubut - 2016. Decreto Provincial N° 2006. Reglamentación Parcial de la Ley XI N° 35. Código Ambiental de la Provincia del Chubut. Disposición, N., 2010. *Boletín Oficial*. 19–21. 113 pp.
- EPA, 2012. *Recreational Water Quality Criteria (RWQC)*. U. S. Environ. Prot. Agency 1–69. doi:820-F-12-058
- Epel, D., Luckenbach, T., Stevenson, C. N., MacManus-Spencer, L. A., Hamdoun, A., Smital, T. 2008. Efflux transporters: Newly appreciated roles in protection against pollutants. *Environmental Science and Technology*, 42(11), 3914–3920. doi:10.1021/es087187v
- Epele, L.B., Miserendino, M.L., 2015. Environmental quality and aquatic invertebrate metrics relationships at patagonian wetlands subjected to livestock grazing pressures. *PLoS One* 10, 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0137873

- Eufemia, N. A., Epel, D. 1998. The multixenobiotic defense mechanism in mussels is induced by substrates and non-substrates: Implications for a general stress response. *Marine Environmental Research*, 46(1-5), 401–405. doi:10.1016/S0141-1136(97)00051-2
- Eufemia, N. A., Epel, D. 2000. Induction of the multixenobiotic defense mechanism (MXR), P-glycoprotein, in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stresses. *Aquatic Toxicology*, 49(1-2), 89–100. doi:10.1016/S0166-445X(99)00068-5
- Eufemia, N., Clerte, S., Girshick, S., Epel, D., 2002. Algal products as naturally occurring substrates for p-glycoprotein in *Mytilus californianus*. *Mar. Biol.* 140, 343–353. <https://doi.org/10.1007/s002270100693>
- Feld, C.K., Fernandes, M.R., Ferreira, M.T., Hering, D., Ormerod, S.J., Venohr, M., Gutiérrez-Cánovas, C., 2018. Evaluating riparian solutions to multiple stressor problems in river ecosystems — A conceptual study. *Water Res.* 139, 381–394. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.04.014>
- Fernanda Moreira, L., Juliana Zomer, S., Marta Marques, S., 2019. Modulation of the multixenobiotic resistance mechanism in *Danio rerio* hepatocyte culture (ZF-L) after exposure to glyphosate and Roundup®. *Chemosphere* 228, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.140>
- Fernández, H.R., Domínguez, E., 2001. Guía para la determinación de los Artrópodos bentónicos sudamericanos. Tucumán, Argentina: EUDET.
- Ferreira, M., Costa, J., Reis-Henriques, M. a, 2014. ABC transporters in fish species: a review. *Front. Physiol.* 5, 266. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00266>
- Fierro, P., Arismendi, I., Jara-flores, A., 2018. A benthic macroinvertebrate multimetric index for Chilean Mediterranean streams. doi:10.1016/j.ecolind.2018.03.074
- Figueroa, R., Valdovinos, C., Araya, E., Parra, O., 2003. Macroinvertebrados bentónicos como indicadores de calidad de agua de ríos del sur de Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 76, 275–285. doi:10.4067/S0716-078X2003000200012
- Folmar, L.C., Sanders, H.O., Julin, A.M., 1979. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 8, 269–278. <https://doi.org/10.1007/BF01056243>
- Freitas, E.C., Rocha, O., 2011. Acute toxicity tests with the tropical cladoceran *Pseudosida ramosa*: The importance of using native species as test organisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 241–249. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9541-2>
- Frolla, F., Aparicio, V., Costa, J.L., Krüger, H., 2018. Soil physical properties under different cattle stocking rates on Mollisols in the Buenos Aires Province, Argentina. *Geoderma Reg.* 14, e00177. <https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2018.e00177>
- Galgani, F., Cornwall, R., Toomey, B. H., Epel, D. 1996. Interaction of environmental xenobiotics with a multixenobiotic defense mechanism in the bay mussel *Mytilus galloprovincialis* from the coast of California. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(3), 325–331. doi:10.1897/1551-5028(1996)015<0325:IOEXWA>2.3.CO;2
- García, A.R., Fleite, S.N., Bereterbide, J. 2016. Marco legal ambiental para el manejo de residuos en producciones animales intensivas. Instituto de tecnología Agropecuaria: INTA-AUDEAS-CONADEV. 26pp.
- García, A.R., Fleite, S.N., Ciapparelli, I., Pugliese, D.V., Weigandt, C., de Iorio, A.F., 2015. Observaciones, desafíos y oportunidades en el manejo de efluentes de feedlot en la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Ecol. Austral* 25, 255–262. doi:10.15585/mmwr.mm6443a4
- García, M.E., Rodríguez Capítulo, A., Ferrari, L.F., 2009. El Ensamble De Invertebrados Y La Calidad Del Agua : Indicadores Taxonómicos Y Funcionales En Arroyos Pampeanos 109–120.

- Georgantzopoulou, A., Skoczynska, E., Van den Berg, J.H.J., Brand, W., Legay, S., Klein, S.G., Rietjens, I.M.C.M., Murk, A.J., 2014. P-GP efflux pump inhibition potential of common environmental contaminants determined in VITRO. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 804–813. <https://doi.org/10.1002/etc.2493>
- Gerhardt, A., 1996. Behavioural early warning responses to polluted water, performance of *Gammarus pulex* L. (Crustacea) and *Hydropsyche angustipennis* (Curtis) (Insecta) to a complex industrial effluent. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 3, 63–70.
- Giller, P.S., Hillebrand, H., Berninger, U., Gessner, M.O., Inchausti, P., Inglis, C., Leslie, H., Malmqvist, B., Monaghan, M.T., Morin, P.J., Mullan, G.O., Giller, P.S., Hillebrand, H., Berninger, U., Gessner, M., Hawkins, S., Inchausti, P., Inglis, C., Leslie, H., Malmqvist, B., Monaghan, M.T., Morin, P.J., Mullan, G.O., 2004. Biodiversity Effects on Ecosystem Functioning: Emerging Issues and Their Experimental Test in Aquatic Environments Published by: Wiley on behalf of Nordic Society Oikos Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/3547804> Your use of th. *Oikos* 104, 423–436.
- Gómez, N., Licursi, M., Bauer, D.E., Ambrosio, E.S., Capitulo, A.R., 2012. Assessment of Biotic Integrity of the Coastal Freshwater Tidal Zone of a Temperate Estuary of South America through Multiple Indicators. *Estuaries and Coasts* 35, 1328–1339. <https://doi.org/10.1007/s12237-012-9528-5>
- Gordon, N.D., McMahon T.A., Finlayson, B.L., 1994. Stream hydrology, an introduction for ecologists. New York: Wiley and Sons.
- Goss, C.W., Goebel, P.C., Sullivan, S.M.P., 2014. Shifts in attributes along agriculture-forest transitions of two streams in central Ohio, USA. *Agric. Ecosyst. Environ.* 197, 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2014.07.026>
- Goss, C.W., Goebel, P.C., Sullivan, S.M.P., 2014. Shifts in attributes along agriculture-forest transitions of two streams in central Ohio, USA. *Agric. Ecosyst. Environ.* 197, 106–117. [doi:10.1016/j.agee.2014.07.026](https://doi.org/10.1016/j.agee.2014.07.026)
- Graeber, D., Jensen, T.M., Rasmussen, J.J., Riis, T., Wiberg-Larsen, P., Baattrup-Pedersen, A., 2017. Multiple stress response of lowland stream benthic macroinvertebrates depends on habitat type. *Sci. Total Environ.* 599–600, 1517–1523. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.102>
- Grunewald, K., Schmidt, W., Unger, C., Hanschmann, G., 2001. Behavior of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in soils and water of reservoir Radeburg II catchment (Saxony/Germany). *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 164, 65–70
- Gualdoni, C. M., Corigliano, M. del C. 1991. El ajuste de un índice biótico para uso regional. *Rev. UNRC*, 11, 43–49.
- Gualdoni, C. M., Oberto, A. M., Raffaini, G. B. 1994. Evaluación de la calidad biológica de los ambientes lóticos de la subcuenca del Río Ctalamotchita (Tercero) (Córdoba, Argentina). *Revista de la Universidad Nacional de Río Cuarto*, 14, 65–80.
- Guitart, E. 2017. Cría bovina en Patagonia Sur. Informe técnico INTA. EEA. Esquel. Chubut. [https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta\\_vi\\_guitart\\_seminario\\_0.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_vi_guitart_seminario_0.pdf)
- Guzha, A.C., Rufino, M.C., Okoth, S., Jacobs, S., Nóbrega, R.L.B., 2018. Impacts of land use and land cover change on surface runoff, discharge and low flows: Evidence from East Africa. *J. Hydrol. Reg. Stud.* 15, 49–67. <https://doi.org/10.1016/j.ejrh.2017.11.005>
- Hach Company., 2007. Hach water analysis handbook, 7th Edition, Loveland, CO (Procedures available: <http://www.hach.com>).
- Hale, R., Reich, P., Daniel, T., Lake, P.S., Cavagnaro, T.R., 2018. Assessing changes in structural vegetation and soil properties following riparian restoration. *Agric. Ecosyst. Environ.* 252, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.09.036>

- Halley, B.A., Jacob, T.A., Lu, A.Y.H., 1989. The environmental impact of the use of ivermectin: environmental effects and fate. *Chemosphere* 18, 1543–1563. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(89\)90045-3](https://doi.org/10.1016/0045-6535(89)90045-3)
- Halling-Sörnsen, B., Nielsen, S. N., Jensen, J. 2002. Environmental assessment of veterinary medicines in Denmark. In Danish Environmental Protection Agency: Copenhagen, Denmark.
- Hamada N., J. H. Thorp, and D. C. Rogers. 2018. Freshwater Invertebrates. Keys to Neotropical Hexapoda. Volme III: Fourth Edition Academic Press. 838 pp.
- Hamdoun, A. M., Griffin, F. J., Cherr, G. N. 2002. Tolerance to biodegraded crude oil in marine invertebrate embryos and larvae is associated with expression of a multixenobiotic resistance transporter. *Aquatic Toxicology*, 61(1-2), 127–140. doi:10.1016/S0166-445X(02)00050-4.
- Herrero, M.A., Gil, S.B., 2008. Consideraciones ambientales de la intensificación en producción animal. Sección Espec. Ecol. Austral Diciembre 18, 273–289. doi:<http://www.scielo.org.ar/pdf/ecoaus/v18n3/v18n3a03.pdf>
- Hickey, C.W., Golding, L.A., Martin, M.L., Croker, G.F., 1999. Chronic toxicity of ammonia to New Zealand freshwater invertebrates: A mesocosm study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 338–351. <https://doi.org/10.1007/s002449900523>
- Higginson, W.P., Downey, P.O., Dyer, F.J., 2019. Changes in vegetation and geomorphological condition 10 years after riparian restoration. *Water (Switzerland)* 11. <https://doi.org/10.3390/w11061252>
- Hodkinson, I.D., Jackson, J.K., 2005. Terrestrial and aquatic invertebrates as bioindicators for environmental monitoring, with particular reference to mountain ecosystems. *Environ. Manage.* 35, 649–666. doi:10.1007/s00267-004-0211-x
- Hooda, P.S., Moynagh, M., Svoboda, I.F., Miller, A., 2000. Macroinvertebrates as bioindicators of water pollution in streams draining dairy farming catchments. *Chem. Ecol.* 17, 17–30. <https://doi.org/10.1080/02757540008037658>
- Horak, C.N., Assef, Y.A., 2017. Influence of Water Temperature on the MXR Activity and P-glycoprotein Expression in the Freshwater Snail,. *Zool. Stud.* 27, 1–11. <https://doi.org/10.6620/ZS.2017.56-27>
- Hughes, A.O., Tanner, C.C., McKergow, L.A., Sukias, J.P.S., 2016. Unrestricted dairy cattle grazing of a pastoral headwater wetland and its effect on water quality. *Agric. Water Manag.* 165, 72–81. doi:10.1016/j.agwat.2015.11.015
- Hyne, R. V., Maher, W. A. . 2003. Invertebrate biomarkers: Links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54, 366–374. doi:10.1016/S0147-6513(02)00119-7
- Iglesias, R., Schorr, A., Villa, M., Vozzi, A., 2015. Situación actual y perspectiva de la ganadería en Patagonia. Ministerio de Agroindustria. Cuadernillos INTA. 25 pp.
- Jergentz, S., Mugni, H., Bonetto, C., Schulz, R. 2005. Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere*, 61(6), 817–826. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.04.036
- Jergentz, S., Pessacq, P., Mugni, H., Bonetto, C., Schulz, R. 2004. Linking in situ bioassays and population dynamics of macroinvertebrates to assess agricultural contamination in streams of the Argentine pampa. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59(2), 133–141. doi:10.1016/j.ecoenv.2004.06.007
- Jones, B. K., Neale, A. C., Nash, M. S., Van Remortel, R. D., Wickham, J. D., Ritters, K. H., O'Neill, R. V. 2001. Predicting nutrient and sediment loading to treams from landscape metrics: A multiple watershed study from the United States Mid-Atlantic Region. *Landscape Ecology*, 16(4), 301–312.

- Jonker, M.N., van Vuren, J.H.J., Wepener, V., 2009. The impact of feedlot effluent on water quality and aquatic macroinvertebrate community structure in streams of the upper Vaal River catchment, South Africa. *African J. Aquat. Sci.* 34, 219–230. doi:10.2989/AJAS.2009.34.3.3.979
- Jordão, R., Campos, B., Lemos, M.F.L., Soares, A.M.V.M., Tauler, R., Barata, C., 2016. Induction of multixenobiotic defense mechanisms in resistant *Daphnia magna* clones as a general cellular response to stress. *Aquat. Toxicol.* 175, 132–143. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.03.015>
- Katharios, P., Pavlidis, M., Iliopoulou-Georgudaki, J., 2004. Accumulation of ivermectin in the brain of sea bream, *Sparus aurata* after intraperitoneal administration. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 17, 9–12. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.01.003>
- Kato, T., Kuroda, H., Nakasone, H., 2009. Runoff characteristics of nutrients from an agricultural watershed with intensive livestock production. *J. Hydrol.* 368, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2009.01.028>
- Kaucner, C.E., Whiffin, V., Ray, J., Gilmour, M., Ashbolt, N.J., Stuetz, R., Roser, D.J., 2013. Can off-river water and shade provision reduce cattle intrusion into drinking water catchment riparian zones? *Agric. Water Manag.* 130, 69–78. doi:10.1016/j.agwat.2013.08.012
- Khan, S. J., Roser, D. J., Davies, C. M., Peters, G. M., Stuetz, R. M., Tucker, R., Ashbolt, N. J. 2008. Chemical contaminants in feedlot wastes: Concentrations, effects and attenuation. *Environment International*, 34(6), 839–859. doi:10.1016/j.envint.2007.10.007.
- Kurelec, B. (1992). The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Critical Reviews in Toxicology*, 22(1), 23–43.
- Kurelec, B. 1997. Pumping-out: the first line cellular defence to water pollutants in aquatic organisms.
- Kurelec, B., Krča, S., Lucić, D., 1996. Expression of multixenobiotic resistance mechanism in a marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of exposure to polluted environments. *Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 113, 283–289. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(96\)84525-7](https://doi.org/10.1016/0742-8413(96)84525-7)
- Kurelec, B., Smital, T., Pivcević, B., Eufemia, N. A., & Epel, D. (2000). Multixenobiotic resistance, P-glycoprotein, and chemosensitizers. *Ecotoxicology*, 9, 307–327
- Kutschker, A. Brand C., Miserendino, M.L., 2009. Evaluación de la calidad de los bosques de ribera en ríos del NO del Chubut sometidos a distintos usos de la tierra. *Ecol. Austral.* 19:19-34.
- Kutschker, A.M., Epele, L.B., Miserendino, M.L., 2014. Aquatic plant composition and environmental relationships in grazed Northwest Patagonian wetlands, Argentina. *Ecol. Eng.* 64, 37–48. doi:10.1016/j.ecoleng.2013.12.007
- Landry, D., Dousset, S., Fournier, J.C., Andreux, F., 2005. Leaching of glyphosate and AMPA under two soil management practices in Burgundy vineyards (Vosne- Romane’e, 21-France). *Environmental Pollution* 138, 191–200.
- Lankas, G.R., Cartwright, M.E., Umbenhauer, D., 1997. P-Glycoprotein deficiency in a subpopulation of CF-1 mice enhances avermectin-induced neurotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 143, 357–365. <https://doi.org/10.1006/taap.1996.8086>
- Lespine, A., Dupuy, J., Orlowski, S., Nagy, T., Glavinas, H., Krajcsi, P., Alvinerie, M., 2006. Interaction of ivermectin with multidrug resistance proteins (MRP1, 2 and 3). *Chem. Biol. Interact.* 159, 169–179. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.11.002>
- Liess, M., Von Der Ohe, P. C. 2005. Analyzing effects of pesticides on invertebrate communities in streams. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(4), 954–965.
- Line, D.E., 2003. Changes in a stream’s physical and biological conditions following livestock exclusion. *Trans. ASAE* 46 (2), 287–293

- Litvan, M.E., Stewart, T.W., Pierce, C.L., Larson, C.J., 2008. Effects of grade control structures on the macroinvertebrate assemblage of an agriculturally impacted stream. *River Res and Application*. 233, 218–233. doi:10.1002/trr
- Loewy, R. M., Monza, L. B., Kirs, V. E., Savini, M. C. 2011. Pesticide distribution in an agricultural environment in Argentina. *J Environmental Sci Health B*, 46(8), 662–670.
- Loo, T. W., Clarke, D. M. 2005. Recent progress in understanding the mechanism of P-glycoprotein-mediated drug efflux. *Journal of Membrane Biology*, 206(3), 173–185.
- Luckenbach T, Fischer S, Sturm A. 2014. Current advances on ABC drug transporters in fish. *Comp Biochem Physiol C* 165:28-52
- Luckenbach, T., Epel, D., 2008. ABCB- and ABCC-type transporters confer multixenobiotic resistance and form an environment-tissue barrier in bivalve gills. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294, 1919–1929. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00563.2007>
- Ludwing, J.A., Reynolds, J.F., 1988. *Statistical Ecology*. Wiley-Interscience, pp. 333.
- Luedeking, A., Van Noorden, C.J.F., et al., 2005. Identification and characterization of a multidrug resistance-related protein mRNA in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 286, 167.
- Luo, P., Liu, F., Zhang, S., Li, H., Yao, R., Jiang, Q., Xiao, R., Wu, J., 2018. Nitrogen removal and recovery from lagoon-pretreated swine wastewater by constructed wetlands under sustainable plant harvesting management, *Bioresource Technology*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.017>
- Macchi, P., Loewy, R.M., Lares, B., Latini, L., Monza, L., Guiñazú, N., Montagna, C.M., 2018. The impact of pesticides on the macroinvertebrate community in the water channels of the Río Negro and Neuquén Valley, North Patagonia (Argentina). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1–11. doi:10.1007/s11356-018-1330-x
- Magner, J.A., Vondracek, B., Brooks, K.N., 2008. Grazed riparian management and stream channel response in southeastern Minnesota (USA) streams. *Environ. Manage.* 42, 377–390. doi:10.1007/s00267-008-9132-4
- Malan, J.A.C., Flint, N., Jackson, E.L., Irving, A.D., Swain, D.L., 2018. Offstream watering points for cattle: Protecting riparian ecosystems and improving water quality? *Agric. Ecosyst. Environ.* 256, 144–152. doi:10.1016/j.agee.2018.01.013
- Mañas, F., Peralta, L., Raviolo, J., García Ovando, H., Weyers, A., Ugnia, L., Gonzalez Cid, M., Larripa, I., Gorla, N., 2009. Genotoxicity of AMPA, the environmental metabolite of glyphosate, assessed by the Comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 834–837. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.09.019>
- Marchese, M., Ezcurra de Drago, I. 1999. Use of benthic macroinvertebrates as organic pollution indicator in lotics environments of the Paraná River Drainage Basin. *Polskie Archiwum Hydrobiologii*, 46(3-4), 233–255.
- Marino, D., Ronco, A. 2005. Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 75, 820–826.
- Masi, C.I., Miserendino, M.L., 2009. usos de la tierra y distribución de la materia orgánica Particulado béntica en ríos de montaña (Patagonia, Argentina). *Ecol. Austral* 19, 185–196.
- Mauad, M., Miserendino, M.L., Risso, M.A., Massaferró, J., 2015. Assessing the performance of macroinvertebrate metrics in the Challhuaco-Ñireco System (Northern Patagonia, Argentina). *Iheringia. Série Zool.* 105, 348–358. doi:10.1590/1678-476620151053348358
- McKergow, L.A., Rutherford, J.C., Timpany, G.C., 2012. Livestock-generated nitrogen exports from a pastoral wetland. *J. Environ. Qual.* 41, 1681–1689

- Mendieta-Pino, C.A., Ramos-Martin, A., Perez-Baez, S.O., Brito-Espino, S., 2019. Management of slurry in Gran Canaria Island with full-scale natural treatment systems for wastewater (NTSW). One year experience in livestock farms. *J. Environ. Manage.* 232, 666–678. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.073>
- Merchán, D., Casali, J., Del Valle de Lersundi, J., Campo-Bescós, M.A., Giménez, R., Preciado, B., Lafarga, A., 2018. Runoff, nutrients, sediment and salt yields in an irrigated watershed in southern Navarre (Spain). *Agric. Water Manag.* 195, 120–132. doi:10.1016/j.agwat.2017.10.004
- Merritt, R., Cummins, K. 1978. An introduction to the aquatic insects of North America. Kendall/Hunt Publishing Company. Puzzle.
- Mesa, L., Mayora, G., Saigo, M., Giri, F., 2015. Nutrient Dynamics in Wetlands of the Middle Paraná River Subjected to Rotational Cattle Management. *Wetlands* 35, 1117–1125. <https://doi.org/10.1007/s13157-015-0699-2>
- Mesa, L.M., 2014. Influence of riparian quality on macroinvertebrate assemblages in subtropical mountain streams. *J. Nat. Hist.* 48, 1153–1167. <https://doi.org/10.1080/00222933.2013.861937>
- Mesa, L.M., Hörler, J., Lindt, I., Gutiérrez, M.F., Negro, L., Mayora, G., Montalto, L., Ballent, M., Lifschitz, A., 2018. Effects of the Antiparasitic Drug Moxidectin in Cattle Dung on Zooplankton and Benthic Invertebrates and its Accumulation in a Water–Sediment System. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 75, 316–326. doi:10.1007/s00244-018-0539-5
- Mesa, L.M., Maldini, C., Mayora, G., Saigo, M., Marchese, M., Giri, F., 2016. Decomposition of cattle manure and colonization by macroinvertebrates in sediment of a wetland of the Middle Paraná River. *J. Soils Sediments* 16, 2316–2325. doi:10.1007/s11368-016-1465-7
- Middleton, B.A., 2013. Rediscovering traditional vegetation management in preserves: Trading experiences between cultures and continents. *Biol. Conserv.* 158, 271–279. doi:10.1016/j.biocon.2012.10.003
- Miglioranza, K.S.B., Gonzalez, M., Ondarza, P.M., Shimabukuro, V.M., Isla, F.I., Fillmann, G., Aizpún, J.E., Moreno, V.J., 2013. Assessment of Argentinean Patagonia pollution: PBDEs, OCPs and PCBs in different matrices from the Río Negro basin. *Sci. Total Environ.* 452-453, 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.055>
- Miller, J. J., Curtis, T., Rogness, D., Willms, W. D., & Chanasyk, D. S. 2018. Influence of Off-Stream Watering Systems on Cattle Behaviour Adjacent to Lower Little Bow River in Southern Alberta. *Applied Animal Behaviour Science.* doi:10.1016/j.applanim.2018.09.004
- Miller, J., Chanasyk, D., Curtis, T., Entz, T., Willms, W., 2010 b. Influence of streambank fencing with a cattle crossing on riparian health and water quality of the Lower Little Bow River in Southern Alberta, Canada. *Agric. Water Manag.* 97, 247–258. doi:10.1016/j.agwat.2009.09.016
- Miller, J., Chanasyk, D., Curtis, T., Entz, T., Willms, W., 2011. Environmental quality of Lower Little Bow River and riparian zone along an unfenced reach with off-stream watering. *Agric. Water Manage.* 98, 1505-1515.
- Miller, S.W., Budy, P., Schmidt, J.C., 2010 a. Quantifying macroinvertebrate responses to in-stream habitat restoration: applications of meta-analysis to river restoration. *Restorat. Ecol.* 18, 8–19. doi. 10.1111/j.1526-100X.2009.00605.x
- Minier, C., Akcha, F., Galgani, F., 1993. P-glycoprotein expression in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* in polluted seawater. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part B Biochem.* 106, 1029–1036. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(93\)90068-G](https://doi.org/10.1016/0305-0491(93)90068-G)
- Minier, C., Borghi, V., Moore, M. N., & Porte, C. (2000). Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis*, 50, 167–176.

- Minier, C., Eufemia, N.A., Epel, D., 1999. The multi-xenobiotic resistance phenotype as a tool to biomonitor the environment. *Biomarkers* 4, 442–454. <https://doi.org/10.1080/135475099230606>
- Minier, C., Moore, M. N. 1996. Rhodamine B accumulation and MXR protein expression in mussel blood cells: effects of exposure to vincristine. *Marine Ecology Progress Series*, 142, 165–173.
- Minier, C., Moore, M. N., Galgani, F., Claisse, D. 2006. Multixenobiotic resistance protein expression in *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* and *Crassostrea gigas* from the French coasts. *Marine Ecology Progress Series*, 322, 143–154. doi:10.3354/meps322143
- Miserendino, M.L, Kutschker, A., Brand, C. La Manna, L., Di Prinzio, C.Y. Papazian, G. and Bava, J, 2016. Ecological Status of a Patagonian Mountain River: Usefulness of Environmental and Biotic Metrics for Rehabilitation Assessment. *Environ. Manage.* 57, 1166–1187. doi:10.1007/s00267-016-0688-0
- Miserendino, M.L, Pizzolón, L.A., 1999. Rapid assessment of river water quality using macroinvertebrates: a family level biotic index for the patagonic andean zone. *Acta Limnologica Brasiliensia* 11 (2), 137-148.
- Miserendino, M.L., 2004. Effects of landscape and desertification on the macroinvertebrate assemblages in Andean Patagonia. *Arch. für Hydrobiol.* 159, 185–209.
- Miserendino, M.L., 2007. Macroinvertebrate functional organization and water quality in a large arid river from Patagonia (Argentina). *Ann. Limnol.* 43 (3), 133–145
- Miserendino, M.L., Archangelsky, M., Brand, C., Epele, L.B., 2012. Environmental changes and macroinvertebrate responses in Patagonian streams (Argentina) to ashfall from the Chaitén Volcano (May 2008). *Sci. Total Environ.* 424, 202–12. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.02.054>
- Miserendino, M.L., Brand, C., Di Prinzio, C.Y., 2008. Assessing urban impacts on water quality, benthic communities and fish in streams of the Andes mountains, Patagonia (Argentina). *Water. Air. Soil Pollut.* 194, 91–110. doi:10.1007/s11270-008-9701-4
- Miserendino, M.L., Casaux, R., Archangelsky, M., Di Prinzio, C.Y., Brand, C., Kutschker, A.M., 2010. Assessing land-use effects on water quality, in-stream habitat, riparian ecosystems and biodiversity in Patagonian northwest streams. *Sci. Total Environ.* 409, 612–624. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.10.034>
- Miserendino, M.L., Casaux, R., Archangelsky, M., Di Prinzio, C.Y., Brand, C., Kutschker, A.M., 2011. Assessing land-use effects on water quality, in-stream habitat, riparian ecosystems and biodiversity in Patagonian northwest streams. *Sci. Total Environ.* 409, 612–624. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.10.034
- Miserendino, M.L., Masi, C.I., 2010. The effects of land use on environmental features and functional organization of macroinvertebrate communities in Patagonian low order streams. *Ecol. Indic.* 10, 311–319. doi:10.1016/j.ecolind.2009.06.008
- Moore, R.D., Richardson, J.S., 2003. Progress towards understanding the structure, function, and ecological significance of small stream channels and their riparian zones. *Can. J. For. Res.* 33, 1349–1351. doi:10.1139/x03-146
- Morello, Jorge Ecorregiones y complejos ecosistemicos argentinos / Jorge Morello ; Silvia Matteucci ; Andrea Rodríguez. - 1 a ed. - Buenos Aires : Orientación Gráfica Editora, 2012. 752 p. ; 26x17 cm.
- Muenz, T.K., Golloday S.W., Vellidis G., Smith L.L., 2006. Stream buffer effectiveness in an agriculturally influenced area, southwestern Georgia: responses of water quality, macroinvertebrates, and amphibians. *J. Environ. Qual.* 35:1924–1938. doi: 10.2134/jeq2005.0456
- Mugni, H., Demetrio, P., Paracampo, A., Pardi, M., Bulus, G., Bonetto, C. 2012. Toxicity Persistence in Runoff Water and Soil in Experimental Soybean Plots Following Chlorpyrifos Application. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 89(1), 208 – 2012.

- Mugni, H., Paracampo, A., Marrochi, N., Bonetto, C. 2013. Acute toxicity of cypermethrin to the non target organism *Hyaella curvispina*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 35(1), 88–92. doi:10.1016/j.etap.2012.11.008
- Mugni, H., Ronco, a., Bonetto, C. 2011. Insecticide toxicity to *Hyaella curvispina* in runoff and stream water within a soybean farm (Buenos Aires, Argentina). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(3), 350–354. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.07.030
- Muller, W.E.G., Steffen, R., Rinkevich, B., Matranga, V., Kurelec, B., 1996. The multixenobiotic resistance mechanism in the marine sponge *Suberites domuncula*; its potential applicability for the evaluation of environmental pollution by toxic compounds. *Mar. Biol.* 125, 165–170.
- Munné, A., Solá, C., Prat, N., 1998. QBR Un índice rápido para la evaluación de la calidad de los ecosistemas de ribera. *Tecnol. del Agua* 175:20–37
- Münze, R., Hannemann, C., Orlinskiy, P., Gunold, R., Paschke, A., Foit, K., Becker, J., Kaske, O., Paulsson, E., Peterson, M., Jernstedt, H., Kreuger, J., Schüürmann, G., Liess, M., 2017. Pesticides from wastewater treatment plant effluents affect invertebrate communities. *Sci. Total Environ.* 599–600, 387–399. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.008>
- Muturi, E.J., Donthu, R.K., Fields, C.J., Moise, I.K., Kim, C.H., 2017. Effect of pesticides on microbial communities in container aquatic habitats. *Sci. Rep.* 7, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep44565>
- Nakamatsu, V., 2006. Pastoreo de mallines: cálculo de la capacidad de carga. *Cartilla de INTA. Ganadería* 20, 87–92
- Negro, C. L., Senkman, L. E., Marino, F., Lorenzatti, E., Collins, P. 2014. Effects of chlorpyrifos and endosulfan on different life stages of the freshwater burrowing crab *Zilchiopsis collastinensis* P.: protective role of chorion. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 92(6), 625–630.
- Nerbonne, B.A., Vondracek, B., 2001. Effects of local land use on physical habitat, benthic macroinvertebrates, and fish in the Whitewater River, Minnesota, USA. *Environ. Manage.* 28, 87–99. doi:10.1007/s002670010209
- Niyogi, D.K., Koren, M., Arbuckle, C.J., Townsend, C.R., 2007. Stream communities along a catchment land-use gradient: Subsidy-stress responses to pastoral development. *Environ. Manage.* 39, 213–225. doi:10.1007/s00267-005-0310-3
- O’Sullivan, M., Ó hUallacháin, D., Antunes, P.O., Jennings, E., Kelly-Quinn, M., 2019. The impacts of cattle access points on deposited sediment levels in headwater streams in Ireland. *River Res. Appl.* 35, 146–158. <https://doi.org/10.1002/rra.3382>
- Odadi, W.O., Fargione, J., Rubenstein, D.I., 2017. Vegetation, Wildlife, and Livestock Responses to Planned Grazing Management in an African Pastoral Landscape. *L. Degrad. Dev.* 28, 2030–2038. <https://doi.org/10.1002/ldr.2725>
- Oosterheld, M., 2008. Impacto de la agricultura sobre los ecosistemas. *Fundamentos ecológicos y problemas más relevantes. Ecol. Austral* 18, 337–346.
- Oles, K.M., Weixelman, D.A., Lile, D.F., Tate, K.W., Snell, L.K., Roche, L.M., 2017. Riparian Meadow Response to Modern Conservation Grazing Management. *Environ. Manage.* 60, 383–395. <https://doi.org/10.1007/s00267-017-0897-1>
- Pain, S., Parant, M. 2007. Identification of multixenobiotic defence mechanism (MXR) background activities in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* as reference values for its use as biomarker in contaminated ecosystems. *Chemosphere*, 67(6), 1258–1263. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.11.017
- Panigatti, J.L., 2010. Argentina: 200 años y 200 suelos - Buenos aires: Ediciones INTA.

- Paracampo, A., Solis, M., Bonetto, C., Mugni, H. 2015. Acute toxicity of chlorpyrifos to the non-target organism *Cnesterodon decemmaculatus*. *International Journal of Environmental Health Research*, 25(1), 96–103.
- Parant, M., Pain, S. 2001. Potential use of multixenobiotic defense mechanism (MXDM) in *Dreissena polymorpha* as a biomarker for the monitoring of freshwater pollution. *water research Oxford*, 35(15), 3743–3748
- Pavé, P. J., Marchesse, M. 2005. Invertebrados bentónicos como indicadores de la calidad del agua en ríos urbanos (Paraná-Entre ríos, Argentina). *Ecología Austral*, 15, 183–197.
- Peeters, E.T.H.M., Brugmans, B.T.M.J., Beijer, J.A.J., Franken, R.J.M., 2006. Effect of silt, water and periphyton quality on survival and growth of the mayfly *Heptagenia sulphurea*. *Aquat. Ecol.* 40, 373–380. doi:10.1007/s10452-005-9026-y
- Peruzzo, P. J., Porta, A. A., Ronco, A. E. 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution*, 156(1), 61–66. doi:10.1016/j.envpol.2008.01.015
- Piscart, C., Genoel, R., Doledec, S., Chauvet, E., Marmonier, P., 2009. Effects of intense agricultural practices on heterotrophic processes in streams. *Environ. Pollut.* 157, 1011–1018. doi:10.1016/j.envpol.2008.10.010
- Pivčević, B., Žaja, R. 2006. Pesticides and their binary combinations as P-glycoprotein inhibitors in NIH 3T3/MDR1 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22(3), 268–276. doi:10.1016/j.etap.2006.04.00
- Pohl, P.C., Klafke, G.M., Carvalho, D.D., Martins, J.R., Daffre, S., Da Silva Vaz, I., Masuda, A., 2011. ABC transporter efflux pumps: A defense mechanism against ivermectin in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Int. J. Parasitol.* 41, 1323–1333. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.08.004>
- Poma, H.R., Gutiérrez Cacciabue, D., Garcé, B., Gonzo, E.E., Rajal, V.B., 2012. Towards a rational strategy for monitoring of microbiological quality of ambient waters. *Sci. Total Environ.* 433, 98–109. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.06.019
- Pordomingo, J. 2004. Engorde a corral : Feedlot.
- Potter, T. L., Bosch, D. D., Strickland, T. C. 2014. Comparative assessment of herbicide and fungicide runoff risk: a case study for peanut production in the Southern Atlantic Coastal Plain (USA). *The Science of the total environment*, 490, 1–10. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.04.034
- Power, M., Adams, S.M., 1997. Perspectives on the Scientific Community on the Status of Ecological Risk Assessment. *Environ. Manage.* 21, 803–830.
- Prat, N., Ríos, B., Acosta, R., Rieradevall, M. 2009. Los macroinvertebrados como indicadores de la calidad de las aguas. In E. Dominguez & H. Fernandez (Eds.), *Macroinvertebrados bentónicos sudamericanos*, Primera Ed. San Miguel de Tucumán: Fundación Miguel Lillo (pp. 631–654).
- Quinn, J. M., Cooper, a. B., Davies-Colley, R. J., Rutherford, J. C., Williamson, R. B. 1997. Land use effects on habitat, water quality, periphyton, and benthic invertebrates in Waikato, New Zealand, hill-country streams. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 31(5), 579–597. doi:10.1080/00288330.1997.9516791
- Ranganath, W.C. Hession, and T.M. Wynn. 2009. Livestock exclusion influences on riparian vegetation, channel morphology, and benthic macroinvertebrate assemblages. *Journal of soil and water conservation.* 64: 1.
- Rasmussen, J. J., Wiberg-Larsen, P., Baattrup-Pedersen, A., Friberg, N., Kronvang, B. 2012. Stream habitat structure influences macroinvertebrate response to pesticides. *Environmental Pollution*, 164, 142–149. doi:10.1016/j.envpol.2012.01.007

- R-Development Core Team, 2016. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Version 3.2.3. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria Available at: <http://www.R-project.org/>
- Reece, P.F., Richardson, J.S., 2000. Biomonitoring with the Reference Condition Approach for the Detection of Aquatic Ecosystems at Risk 549–552.
- Richardson, J.S., Danehy, R.J., 2007. A synthesis of the ecology of headwater streams and their riparian zones in temperate forests. *For. Sci.* 53, 131–147.
- Richardson, J.S., Sato, T., 2015. Resource subsidy flows across freshwater-terrestrial boundaries and influence on processes linking adjacent ecosystems. *Ecohydrology* 8, 406–415. doi:10.1002/eco.1488
- Riley, R., Townsend, C., Niyogi, D., Arbuckle, C., Peacock, K., 2003. Headwater stream response to grassland agricultural development in New Zealand. *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* 37, 389–403. doi:10.1080/00288330.2003.9517175
- Rizzo, P.F., Bres, P.A., Arreghini, S., Crespo, D.E., Serafini, R.J.M., Fabrizio de Iorio, A.R., 2012. Remediation of feedlot effluents using aquatic plants. *Rev. la Fac. Ciencias Agrar.* 44, 47–64. doi:10.1002/lt.
- Rodrigues-Capítulo, A., Tangorra, M., Ocón, C. 2001. Benthic macroinvertebrate to assess the ecological status of pampean rivers (Argentina). *Aquatic Ecology*, 35, 109–119.
- Rosenbaum, E. A., Duboscq, L., Soleño, J., Montagna, C. M., Ferrari, A., Venturino, A. 2012. Response of biomarkers in amphibian larvae to in situ exposures in a fruit-producing region in North Patagonia, Argentina. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(10), 2307–2311.
- Rosenberg, D. M., Resh, V. 1993. *Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates*. In Chapman & Hall. New York-London (p. 486).
- Rosso, J.J., Fernández Cirelli, A., 2013. Effects of land use on environmental conditions and macrophytes in prairie lotic ecosystems. *Limnologia* 43, 18–26. doi:10.1016/j.limno.2012.06.001
- Rutherford, J. C., Blackett, S., Blackett, C., Saito, L., Davies-Colley, R. J. 1997. Predicting the effects of shade on water temperature in small streams. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 31(5), 707–721. doi:10.1080/00288330.1997.9516801
- Rzymiski, P., Klimaszuk, P., Kubacki, T., Poniedziałek, B., 2013. The effect of glyphosate-based herbicide on aquatic organisms – a case study 215–220. <https://doi.org/10.2478/limre-2013-0024>
- Sánchez, E., Colmenarejo, M. F., Vicente, J., Rubio, A., García, M. G., Travieso, L. & Borja, R. 2007. Use of the water quality index and dissolved oxygen deficit as simple indicators of watersheds pollution. *Ecological Indicators*, 7, 315–328.
- Sanderson, H., Laird, B., Pope, L., Brain, R., Wilson, C., Johnson, D., Bryning, G., Peregrine, A., Boxall, A., Solomon, K., 2007. Assessment of the environmental fate and effects of ivermectin in aquatic mesocosms. *Aquat. Toxicol.* 85, 229–240. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.08.011>
- Santos, L.H.M.L.M., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C.B.S.M. 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 175, 45–95. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.100>
- Scanes, C.G., 2018. Chapter 18 - Impact of Agricultural Animals on the Environment. *Anim. Hum. Soc.* 427–449. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805247-1.00025-3>
- Scarsbrook, M. R., Halliday, J. 1999. Transition from pasture to native forest land-use along stream continua: Effects on stream ecosystems and implications for restoration. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 33(2), 293–310. doi:10.1080/00288330.1999.9516878
- Schäfer, R. B., Caquet, T., Siimes, K., Mueller, R., Lagadic, L., Liess, M. 2007. Effects of pesticides on community structure and ecosystem functions in agricultural streams of three biogeographical regions in Europe. *Science of the Total Environment*, 382(2-3), 272–285. doi:10.1016/j.scitotenv.2007.04.040

- Schueler, T., Brown, K. 2004. Manual 4: Urban Stream Repair Practices. Urban Subwatershed Restoration Manual Series. Center for Watershed Protection, Ellicott City, MD.
- Schwarte, K.A., Russell, J.R., Kovar, J.L., Morrical, D.G., Ensley, S.M., Yoon, K.-J., Cornick, N.A., Cho, Y. II, 2011. Grazing Management Effects on Sediment, Phosphorus, and Pathogen Loading of Streams in Cool-Season Grass Pastures. *J. Environ. Qual.* 40, 1303. <https://doi.org/10.2134/jeq2010.0524>
- Scrimgeour, G.J., Kendall, S., 2003. Effects of livestock grazing on benthic invertebrates from a native grassland ecosystem. *Freshw. Biol.* 48, 347–362. Doi: 10.1046/j.1365-2427.2003.00978.x
- Shilla, D.J., Shilla, D.A., 2011. The effects of catchment land use on water quality and macroinvertebrate assemblages in Otara Creek, New Zealand. *Chem. Ecol.* 27, 445–460. doi:10.1080/02757540.2011.575374
- Simonsen, L., Fomsgaard, I.S., Svensmark, B., Spliid, N.H., 2008. Fate and availability of glyphosate and AMPA in agricultural soil. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* 43, 365–375. <https://doi.org/10.1080/03601230802062000>
- Smital, T., Kurelec, B. 1998. The activity of multixenobiotic resistance mechanism determined by rhodamine B efflux method as a biomarker of exposure. *Marine Environmental Research*, 46, 443–447.
- Smital, T., Kurelec, B., 1998. The activity of multixenobiotic resistance mechanism determined by rhodamine B efflux method as a biomarker of exposure. *Mar. Environ. Res.* 46, 443–447.
- Smital, T., Luckenbach, T., Sauerborn, R., Hamdoun, A. M., Vega, R. L., Epel, D. 2004. Emerging contaminants - Pesticides, PPCPs, microbial degradation products and natural substances as inhibitors of multixenobiotic defense in aquatic organisms. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 552(1-2), 101–117. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.06.006
- Smital, T., Sauerborn, R., Hackenberger, B. K. 2003. Inducibility of the P-glycoprotein transport activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* and the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Toxicology*, 65, 443–465.
- Smital, T., Sauerborn, R., Pivčević, B., & Kurelec, B. 2000. Inhibition of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms by commercially used pesticides. *Marine Environmental Research*, 50(1-5), 334–335.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1995. *Biometry*, 3rd ed. W.H. Freeman and Company, New York, pp. 859.
- Solis, M., Bonetto, C., Marrochi, N., Paracampo, A., Mugni, H., 2018. Ecotoxicology and Environmental Safety Aquatic macroinvertebrate assemblages are affected by insecticide applications on the Argentine Pampas. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 148, 11–16. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.10.017
- Song, M.Y., Leprieur, F., Thomas, A., Lek-Ang, S., Chon, T.S., Lek, S., 2009. Impact of agricultural land use on aquatic insect assemblages in the Garonne river catchment (SW France). *Aquat. Ecol.* 43, 999–1009
- Sturm, A., Ziemann, C., Hirsch-Ernst, K. I., Segner, H. 2001. Expression and functional activity of P-glycoprotein in cultured hepatocytes from *Oncorhynchus mykiss*. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 281, R1119–R1126.
- Sutherland, A.B., Culp, J.M., Benoy, G.A., 2012. Evaluation of deposited sediment and macroinvertebrate metrics used to quantify biological response to excessive sedimentation in agricultural streams. *Environ. Manage.* 50, 50–63. doi:10.1007/s00267-012-9854-1
- Svensson, O., Bellamy, A.S., Van den Brink, P.J., Tedengren, M., Gunnarsson, J.S., 2017. Assessing the ecological impact of banana farms on water quality using aquatic macroinvertebrate community composition. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 13373–13381. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8248-y>

- Taniwaki, R.H., Cassiano, C.C., Fransozi, A.A., Vásquez, K. V., Posada, R.G., Velásquez, G. V., Ferraz, S.F.B., 2019. Effects of land-use changes on structural characteristics of tropical high-altitude Andean headwater streams. *Limnologia* 74, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2018.10.002>
- Ter Braak, C.J.F. Smilauer, P. 1998. CANOCO reference manual and user's guide to canoco for windows: software for canonical community ordination (version 4). Microcomputer power, Ithaca, p 352
- Tonkin, J.D., 2014. Drivers of macroinvertebrate community structure in unmodified streams. *PeerJ* 2, e465. <https://doi.org/10.7717/peerj.465>
- Toomey, B.H., Epel, D., 1993. Multixenobiotic resistance in *Urechis caupo* embryos: Protection from environmental toxins. *Biol. Bull.* 185, 355–364. <https://doi.org/10.2307/1542476>
- Toomey, B.H., Kaufman, M.R., Epel, D., 1996. Marine bacteria produce compounds that modulate multixenobiotic transport activity in *Urechis caupo* embryos. *Mar. Environ. Res.* 42, 393–397.
- Tutundjian, R., Minier, C. 2007. Effect of temperature on the expression of P-glycoprotein in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Journal of Thermal Biology*, 32(3), 171–177. doi:10.1016/j.jtherbio.2007.01.008
- USDA. 2003. United States Department of Agriculture. Natural Resources Conservation Service. National water quality handbook 1–368.
- Valton, E., Amblard, C., Wawrzyniak, I., Penault-Llorca, F., Bamdad, M. 2013. P-gp expression in brown trout erythrocytes: evidence of a detoxification mechanism in fish erythrocytes. *Scientific Reports* (Vol. 3). doi:10.1038/srep03422
- Van Bruggen, A.H.C., He, M.M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K.C., Finckh, M.R., Morris, J.G., 2018. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Sci. Total Environ.* 616-617, 255–268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309>
- Vannote, R. L., Minshall, G. W., Cummins, K. W., Sedell, J. R., & Cushing, C. E. (1980). The River Continuum Concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37(1), 130–137. doi:10.1139/f80-017
- Velásquez S. M. & Miserendino, M. L. 2003. Análisis de la materia orgánica alóctona y organización funcional de macroinvertebrados en relación con el tipo de hábitat en ríos de montaña de Patagonia. *Ecología Austral* 13:67-82.
- Venables W.N., Ripley B.D., 2002. *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0.
- Venturino, A., Pechen de D'Angelo, A. M. 2005. Biochemical targets of xenobiotics: Biomarkers in amphibian ecotoxicology. *Applied Herpetology*, 2, 335–353
- Vidon, P., Campbell, M.A., Gray, M., 2008. Unrestricted cattle access to streams and water quality in till landscape of the Midwest. *Agric. Water Manag.* 95, 322–330. doi:10.1016/j.agwat.2007.10.017
- Vilaboa, N. E., Galan, A., Troyano, A., De Blas, E., Aller, P. 2000. Regulation of multidrug resistance 1 (MDR1)/P-glycoprotein gene expression and activity by heat-shock transcription factor 1 (HSF1). *Journal of Biological Chemistry*, 275(32), 24970–24976. doi:10.1074/jbc.M909136199
- Villeneuve, A., Montuelle, B., Bouchez, A., 2011. Effects of flow regime and pesticides on periphytic communities: Evolution and role of biodiversity. *Aquat. Toxicol.* 102, 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.01.004>
- Vondracek, B., Blann, K.L., Cox, C.B., Nerbonne, J.F., Mumford, K.G., Nerbonne, B.A., Sovell, L.A., Zimmerman, J.K.H., 2005. Land use, spatial scale, and stream systems: Lessons from an agricultural region. *Environ. Manage.* 36, 775–791. doi:10.1007/s00267-005-0039-z
- Wei, T., Simko, V., 2016. The Corrplot Package. R Core Team, pp. 1–17

- Wen, T., Sheng, S., An, S., 2016. Relationships between stream ecosystem properties and landscape composition at multiple spatial scales along a heavily polluted stream in China: Implications for restoration. *Ecol. Eng.* 97, 493–502. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.10.028>
- Wetzel, R. G., Likens, G. E., 1991. *Limnological Analyses*. Springer-Verlag, New York, NY, USA
- Wickham H., 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.
- Wilcock, R.J., Monaghan, R.M., Quinn, J.M., Srinivasan, M.S., Houlbrooke, D.J., Duncan, M.J., Wright-Stow, A.E., Scarsbrook, M.R., 2013. Trends in water quality of five dairy farming streams in response to adoption of best practice and benefits of long-term monitoring at the catchment scale. *Mar. Freshw. Res.* 64, 401–412. <https://doi.org/10.1071/MF12155>
- Winterbourn, M. J. 1981. The use of aquatic invertebrates in studies of stream water quality. *Water & Soil Publication*, 22, 5–16.
- Wooster, D.E., DeBano, S.J., 2018. The importance of scale in understanding the effect of stream intermittence on aquatic macroinvertebrate diversity 1–11. doi:10.1002/rra.3352
- Xue, F., Tang, J., Dong, Z., Shen, D., Liu, H., Zhang, X., Holden, N.M., 2018. Tempo-spatial controls of total coliform and *E. coli* contamination in a subtropical hilly agricultural catchment. *Agric. Water Manag.* 200, 10–18. doi:10.1016/j.agwat.2017.12.034
- Yusa, K., Tsuruo, T., 1989. Reversal mechanism of multidrug resistance by verapamil: Direct binding of verapamil to P-glycoprotein on specific sites and transport of verapamil outward across the plasma membrane of K562/ADM cells. *Cancer Res.* 49, 5002–5006.
- Zaja, R., Caminada, D., Lonncar, J., Fent, K., Smital, T. 2008. Development and characterization of P-glycoprotein 1 (Pgp1, ABCB1) mediated doxorubicin resistant PLHC-1 hepatoma fish cell line. *Toxicology and applied pharmacology*, 227, 207–218.
- Zhang, W., Ling, V. 2000. Cell-cycle-dependent turnover of P-glycoprotein in multidrug-resistant cells. *Journal of Cellular Physiology*, 184, 17–26.
- Zuur AF, Hilbe JM, Ieno EN. 2013. *A beginner's guide to GLM and GLMM with R. A frequentist and Bayesian perspective for ecologist*. United Kingdom: Highland Statistics Ltd.

Esquel, 21 de Octubre de 2019



Lic. Cristina N. Horak  
Tesisista  
DNI: 34.403.953



Dra. Yanina A. Assef  
Directora  
DNI: 23.401.824



Dra. Nora Gómez  
Directora  
DNI: 12.864.932