

Seminario de Licenciatura en Ciencias Biológicas

Efectos biológicos de la salinidad y el amonio en *Hyalella curvispina* Shoemaker, 1942 (Crustacea, Amphipoda) y su aplicación en estudios de toxicidad de agua

**Alumna: Florencia Suyay Acosta
Directora: Dra. Yanina Assef
Co-Directora: Dra. Cecilia Brand**

**Universidad Nacional de la Patagonia
San Juan Bosco
Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud**

Año 2020



Seminario para optar por el título de grado de Licenciado en Ciencias Biológicas

Efectos biológicos de la salinidad y el amonio en *Hyaella curvispina* Shoemaker, 1942 (Crustacea, Amphipoda) y su aplicación en estudios de toxicidad de agua

Alumna: Florencia Suyay Acosta
Licenciatura en Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud
Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco
Sede Esquel

Directora: Dra. Yanina Assef
Co-Directora: Dra. Cecilia Brand
Profesor asesor: Dr. Laureano González Ruiz
Centro de Investigación Esquel de Montaña y Estepa Patagónica (CIEMEP)
CONICET – UNPSJB Sede Esquel

Lugar de realización: Centro de Investigación Esquel de Montaña y Estepa Patagónica (CIEMEP)

INDICE

AGRADECIMIENTOS	5
1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN.....	8
2.1 Evaluación de la calidad del agua	11
2.2 Organismo de estudio: <i>Hyalella curvispina</i>	13
2.3 El uso de <i>Hyalella curvispina</i> en Argentina.....	15
2.4 Antecedentes en Patagonia.....	16
3. OBJETIVOS.....	18
Objetivo general	18
Objetivos específicos.....	18
4. HIPÓTESIS	19
Hipótesis general	19
Hipótesis específicas	19
5. MATERIALES Y METODOS	20
5.1 Obtención de los organismos en campo	20
5.2 Obtención de agua para ensayos	21
5.3 Análisis físico-químicos del agua	23
5.4 Variables de respuesta.....	24
5.5 Prueba de mantenimiento de <i>Hyalella curvispina</i> en laboratorio y puesta a punto de los ensayos	24
5.6 Ensayos de toxicidad.....	26
5.6.1 Bioensayos con NaCl	26
5.6.2 Bioensayos con NH ₄ Cl.....	27

5.6.3 Bioensayos con agua contaminada.....	28
5.7 Análisis de datos.....	29
6. RESULTADOS	30
6.1 Prueba de mantenimiento de <i>Hyalella curvispina</i> en laboratorio y puesta a punto de los ensayos	30
6.2 Ensayos de toxicidad.....	34
6.2.1 Bioensayos con NaCl	34
6.2.2 Bioensayos con NH ₄ Cl.....	37
6.2.3 Bioensayos con agua contaminada.....	40
6.2.3.1 Parámetros físico-químicos y nutrientes del agua	40
6.2.3.2 Bioensayos con aguas del Arroyo Esquel.....	41
6.2.3.3 Bioensayos con aguas del Arroyo Esquel en ausencia de plantas acuáticas	44
7. DISCUSION.....	47
8. CONCLUSIONES.....	58
9. BIBLIOGRAFIA.....	59
10. ANEXO.....	69

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, principalmente a mis padres, por darme todo el apoyo y herramientas necesarias para impulsarme a ir siempre hacia adelante,

A Seba, quien compartió conmigo todos los años de carrera, donde hubo muchas horas de estudio, algunos nervios y miedos, pero también muchas alegrías con cada examen rendido y avance logrado. Su ayuda y compañía en esta última etapa fueron muy importantes para mí,

A mi directora Dra. Yanina Assef y mi co-directora Dra. Cecilia Brand, por acompañarme a lo largo de esta última etapa con mucha paciencia y dedicación, por enseñarme a ver y a analizar las cosas de otra manera, abriéndome las puertas a un mundo sumamente interesante con el cual quede encantada! Gracias por todos los consejos que me dieron en el camino, por la buena onda que tienen todos los días y por todos los viajes para buscar a nuestras pequeñas hyalellas y así poder realizar cada uno de los ensayos. Todo esto tiene un gran valor para mí. Trabajar con ustedes es muy cómodo y divertido!,

A mi profesor asesor, Dr. Laureano González-Ruíz, por despejarme las dudas, y tener siempre buena predisposición cuando necesité una mano,

A todo el grupo que conforma el CIEMEP, por permitirme realizar los ensayos y análisis en el laboratorio, especialmente a Analía y Mauri por abrirme la puerta todos los días!,

A la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco y a cada uno de los profesores y docentes, por enseñarnos, formarnos y guiarnos en este camino de la biología.

Gracias a todos!!

1. RESUMEN

Con el paso del tiempo, el agua ha sufrido un gran deterioro debido a diferentes actividades antrópicas que ocasionan consecuencias muy variadas en la biota (letalidad, cambios en la reproducción, desarrollo, crecimiento, estructura y dinámica poblacional). La respuesta de los organismos a los diferentes tóxicos dependerá de su concentración, el entorno donde viven y su vulnerabilidad. En este aspecto, los bioensayos son herramientas muy útiles para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Estos ensayos integran los cambios sufridos por los ecosistemas a lo largo de la vida del organismo, otorgando información complementaria a los análisis físico-químicos. Uno de los grupos de invertebrados más utilizados en estas pruebas son los crustáceos, por su sensibilidad, su amplia distribución y su fácil manipulación en laboratorio. En estos ensayos, el uso de especies de nuestra región, adaptadas a las características ambientales de los sitios bajo estudio, permite brindar resultados más realistas y confiables frente a los obtenidos a partir de especies exóticas. El presente estudio tiene como objetivo general evaluar la utilización de una especie nativa de Sudamérica *Hyalella curvispina* (Shoemaker, 1942) en bioensayos para estudiar el efecto de contaminantes de ambientes acuáticos.

Para esto, se realizaron cuatro pruebas de 14 días cada una, 1) mantenimiento de las hyalellas en laboratorio y puesta a punto de los ensayos, 2) bioensayo para evaluar los efectos tóxicos de la salinidad, con seis concentraciones de cloruro de sodio (NaCl), 3) bioensayo para evaluar el efecto tóxico del amonio, con cuatro concentraciones de cloruro de amonio (NH₄Cl), y 4) bioensayo con agua proveniente de tres sitios del Arroyo Esquel con diferente grado de contaminación. Los organismos fueron recolectados de la Reserva Natural Urbana (RNU) Laguna la Zeta y aclimatados en el laboratorio. Se utilizaron tres réplicas por tratamiento para las tres primeras pruebas, y cinco para la última. Los parámetros evaluados fueron sobrevivencia, peso seco y formación de amplexos.

En la prueba de mantenimiento y puesta a punto de los organismos en laboratorio se evaluó la sobrevivencia en base a la presencia/ ausencia de plantas acuáticas y aireación, encontrándose que los organismos mantenidos con plantas acuáticas, tuvieron una mayor sobrevivencia para el día 14 presentando valores entre 72,3 (con aireación) y 61,9 % (sin aireación) frente a aquellos en donde las plantas acuáticas estaban ausentes, que no superaron

el 36,2 % de sobrevida. Como también se observó que la oxigenación modifica las concentraciones efectivas de NH_4Cl , se procedió a realizar los restantes ensayos de toxicidad en presencia de plantas acuáticas y sin aireación. Además, se observó la formación de amplexos, algo que no ocurrió en las demás pruebas.

En el ensayo para evaluar la toxicidad de la salinidad por incremento de NaCl , se observó una mayor sobrevida en las concentraciones más bajas (0,1 y 0,01 mg/l) siendo de 22,2 y 44,4 %, respectivamente hacia el final del ensayo, mientras que para la más alta (10 mg/l) fue de 6,3 %. Los valores de respuesta al día 8 del ensayo permitieron estimar la concentración letal media (CL50) promedio del NaCl que fue de 0,98 g/l, lo que equivale a conductividades eléctricas del agua muy altas (superiores a 1600 $\mu\text{S}/\text{cm}$), no encontradas comúnmente en ambientes acuáticos de nuestra región.

En la prueba para determinar la toxicidad del amonio, se encontró que al día 14, la mayor sobrevida de hyalellas ocurrió en las concentraciones más bajas (5 y 10 mg/l) con valores de 48,9 y 33,3 %, respectivamente, mientras que en la más alta (30 mg/l) fue de 4,4 %. La CL50 promedio obtenida para el NH_4Cl fue de 14,9 mg/l a los 8 días de ensayo, valor que se encuentra dentro del rango histórico de concentraciones encontradas en los sitios más contaminados del Arroyo Esquel.

Por último, en los bioensayos para evaluar la toxicidad de aguas con distintos grados de contaminación, la mayor sobrevida se observó con el agua procedente del sitio de referencia (22,7 %), mientras que para el agua de sitio de contaminación media la sobrevida fue de 4,3 %, no habiendo organismos sobrevivientes en el de mayor contaminación en el día final de la prueba. A la mitad del ensayo se evidenció un efecto diferencial en la sobrevida de las hyalellas entre los tres tratamientos, en coincidencia con el gradiente de contaminación.

Este estudio destaca la potencialidad del uso de *H. curvispina* como organismo de prueba en ensayos de toxicidad, demostrando sensibilidad a incrementos de salinidad y amonio, y una respuesta gradual en presencia de aguas con distinto grado de contaminación aceptando las hipótesis propuestas. Con este trabajo se aportan datos sobre métodos de obtención en campo y mantenimiento en laboratorio de los organismos, los cuales serán muy útiles para llevar a cabo distintos ensayos experimentales en el futuro con especies nativas.

Palabras clave: *Hyaella curvispina*, anfípodos, amonio, salinidad, calidad del agua, ecotoxicidad, Patagonia.

2. INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso natural escaso, muy importante para la vida humana y el sostenimiento del medio ambiente. En los últimos tiempos, la calidad del agua ha sufrido un deterioro alarmante debido al aumento exponencial de la población mundial, el rápido desarrollo económico, y a las diferentes actividades antrópicas que actúan desequilibrando los sistemas naturales (Barceló & López, 2008). Los ecosistemas de agua dulce están especialmente sujetos a múltiples presiones: extracción de agua, descargas de efluentes industriales y domésticos, propagación de especies invasoras, alteración de la hidrología, degradación del hábitat y sobreexplotación de recursos, entre otros (Allan & Castillo, 2007).

A principios del siglo XIX, el problema de la contaminación comenzó a hacerse notable junto con la escasez de agua, la cual está adquiriendo grandes proporciones como consecuencia del cambio climático y la desertificación del planeta. Las acciones humanas interrumpen los procesos geomórficos que mantienen el paisaje de los ríos y su biota asociada y con frecuencia resultan en un hábitat degradado y menos heterogéneo (Allan, 2004). La mayoría de las actividades humanas que utilizan agua (e.g. urbanización, industria, agricultura, ganadería) generan aguas residuales, siendo éstas la fuente de contaminación más importante de los ecosistemas acuáticos (Barceló & López, 2008). A medida que la demanda global de estas actividades aumenta, también lo hace el volumen de las aguas residuales y su nivel de contaminación, ya que una vez que el agua ha sido utilizada se la considera como una carga a ser eliminada. En la mayoría de los países son vertidas directamente al medio ambiente sin un tratamiento adecuado teniendo repercusiones negativas en la salud humana, la productividad económica, la calidad de los recursos de agua dulce ambiental y los ecosistemas (ONU, 2017). Dentro de los parámetros del agua que se ven modificados por las actividades humanas se encuentran el pH, el nivel de oxígeno disuelto, los sólidos en suspensión, la salinidad y conductividad eléctrica, los nutrientes (e.g. amonio, nitritos, nitratos, fosfatos) y la presencia de microorganismos, entre otros. La entrada de orina y materia fecal a los ambientes acuáticos, aumenta los niveles de algunas formas de nitrógeno como nitratos y amonio, acelerando los procesos de eutrofización. Asimismo, diferentes sustancias de uso agrícola-ganadero como fertilizantes, pesticidas, fármacos de uso veterinario, etc., que entran en contacto con el agua pueden afectar el funcionamiento de las especies. El uso de la tierra agrícola produce importantes degradaciones al aumentar las entradas de contaminantes, impactando el hábitat ribereño y alterando los flujos de agua. Un

mayor uso de la tierra se ve acompañado de mayores aportes de sedimentos, nutrientes y pesticidas a los distintos cuerpos de agua (Allan, 2004; Horak et al., 2019).

De todos los parámetros del agua que se ven alterados como consecuencia de las actividades humanas mencionados anteriormente, en este estudio se pone el foco principalmente sobre dos de ellos: salinidad y amonio. Los parámetros se seleccionaron dado que se modifican rápidamente frente a un disturbio y además son de los más comúnmente asociados a efectos de las actividades antrópicas en la región.

La contaminación y los procesos erosivos introducen sustancias en los ecosistemas acuáticos de diferente composición y estructura química, entre ellas iones, que contribuyen al aumento de la salinidad. La salinidad en un ambiente natural es una medida de una mezcla de iones (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^-). Es un parámetro considerado de suma importancia debido a que representa una de las principales propiedades ambientales que definen y limitan la distribución de los invertebrados, influyendo en su abundancia y desarrollo de acuerdo a su tolerancia. Cuando los niveles de salinidad se incrementan, los organismos acuáticos sensibles son gravemente afectados, mientras que los organismos tolerantes requieren un coste energético mayor para regular y equilibrar sus procesos metabólicos (Guerra Jara, 2017). La salinidad puede ejercer efectos indirectos mediante la modificación de la composición de especies en una comunidad, afectando la estructura y funcionamiento de los ecosistemas (Milanesi Camejo, 2015). Distintas especies (aún dentro del mismo género) presentan diferentes rangos de tolerancia a la salinidad. Entender cómo varía la tolerancia entre poblaciones al estrés ambiental es importante, ya que permite predecir los efectos del cambio climático en especies localmente adaptadas a su ambiente abiótico (Albarrán Méizer et al., 2017).

Dentro de este marco, muchos trabajos de laboratorio demostraron el impacto de la salinidad sobre diferentes aspectos vitales en organismos marinos y estuarinos. El análisis de la salinidad y la dieta sobre el desarrollo larvario del cangrejo *Sesarma ricordi* (H. Milne Edwards, 1853) demostró que este organismo presenta una alta tolerancia a un amplio rango de salinidades, afectando la combinación de la salinidad y la dieta a la sobrevivencia, el tiempo de muda y la duración del estado larval (Álvarez & Ewald, 1990). Mediante el estudio de los efectos de la temperatura y la salinidad sobre el crecimiento y sobrevivencia del pez *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869), se ha demostrado que esta especie, por su tolerancia a bajas salinidades, presenta un alto potencial para crecer en sistemas lagunares-estuarinos con

salinidades bajas (entre 15 y 35 mg/l) (Alcalá-Carrillo et al., 2016). Albarrán-Mélzer y colaboradores (2017) evaluaron el efecto de la salinidad en cuatro especies de gasterópodos dulceacuícolas nativos y dos introducidos en México para conocer la capacidad de adaptación en un ambiente salino producido por la intrusión de agua salina a un cuerpo de agua dulce, observando que la tolerancia a la salinidad entre las especies introducidas no mostró diferencias importantes con dos de las especies nativas, pero sí con las dos restantes, quienes mostraron una tolerancia menor.

Otros estudios demuestran el impacto de la salinidad en crustáceos de agua dulce. Sarma y colaboradores (2005), probaron el efecto del NaCl (entre 0 y 8 g/l) sobre *Branchipus schaefferi* (Fishcher, 1834) observando que tanto machos como hembras presentaban una baja sobrevivencia y producción de descendencia a niveles de salinidad más altos. Por otro lado, la tolerancia a la salinidad de *Daphnia magna* (Straus, 1820) fue evaluada por Martínez-Jerónimo y Martínez-Jerónimo (2007), observando reducciones significativas en la sobrevivencia a las concentraciones más elevadas, además de una disminución en la movilidad. También observaron reducciones de parámetros demográficos con la concentración, tales como promedio de vida, esperanza de vida, tasa reproductiva neta, tasa generacional y tasa de crecimiento de la población.

Las distintas actividades antrópicas no solo permiten el ingreso de iones que llevan a un aumento de la salinidad de los cursos de agua, sino también de otro tipo de compuestos que pueden ejercer efectos tóxicos sobre la biota. Una de las formas iónicas reactivas del nitrógeno es el amonio (NH_4^+), el cual se puede encontrar de manera natural en los ecosistemas acuáticos como consecuencia de la deposición atmosférica, dilución de depósitos geológicos ricos en nitrógeno, descomposición biológica de la materia orgánica y fijación de nitrógeno por la acción de determinados organismos. A pesar de esto, las actividades antropogénicas alteran significativamente el ciclo del nitrógeno, aumentando su disponibilidad en muchas regiones del planeta como consecuencia de fuentes puntuales de contaminación (Camargo & Alonso, 2007), permitiendo que diferentes fuentes de nitrógeno ingresen al sistema hídrico mediante el uso de fertilizantes, residuos domésticos, aguas residuales humanas, efluentes industriales (procedentes de industrias alimenticias, textiles, del papel, etc.), y excretas animales (Fernández, 2005). Debido a que el ion amonio posee carga positiva en su estructura química, puede retenerse en las partículas de arcilla del suelo cuya carga es negativa, por lo que es relativamente inmóvil en el suelo y por lo general no se

incorpora al agua subterránea (Díaz, 1985). A escala local (cordillera patagónica), las principales actividades antrópicas que promueven la entrada de nutrientes en el agua son el vertido de efluentes cloacales y la ganadería que aumentan los niveles de nutrientes, generando procesos de eutrofización. Los posibles efectos de la contaminación orgánica pueden atribuirse a formas de amoniaco (nitritos, nitratos y amonio), que en algunos casos tienen consecuencias en la biota (Horak et al., 2019; Miserendino et al., 2016).

Algunos estudios ecotoxicológicos realizados en el país han analizado los efectos del amonio sobre diferentes aspectos de organismos acuáticos. En uno de ellos, se expusieron a organismos de agua dulce a diferentes concentraciones de amonio, observando que el crustáceo *Gammarus pulex* (Linnaeus, 1758) fue el más sensible a la contaminación de amonio, mientras que especies como el tricóptero *Limnephilus lunatus* (Curtis, 1834) y el gasterópodo *Radix ovata* (Draparnaud, 1805) exhibieron efectos tóxicos solo a concentraciones diez veces más altas (Berenzen et al., 2001). Peluso (2011) realizó ensayos de toxicidad con juveniles de *H. curvispina*, exponiéndolos a sedimentos con concentraciones de 3,8; 6 y 16 mg/l de N-NH₄⁺. Si bien la concentración más alta presentó una menor sobrevivencia (56 %), no hubo diferencias significativas entre las distintas concentraciones y los controles. De este modo, la mortalidad no fue asociada a la concentración de nitrógeno amoniacal. Para evaluar el efecto del N-NH₄⁺ sobre la sobrevivencia de especímenes de *H. curvispina*, Giusto (2014) realizó ensayos por separado con machos adultos y con juveniles. Los adultos presentaron sobrevivencias mayores al 80 % por exposición a concentraciones entre 0, 5 y 10 mg/l, mientras que en los juveniles fueron mayores al 60 %, sugiriendo que esta especie es tolerante a elevadas concentraciones de nitrógeno amoniacal.

2.1 Evaluación de la calidad del agua

Existen diversas técnicas de diagnóstico para poder realizar un monitoreo ambiental del agua, como la evaluación de parámetros físico-químicos, la utilización de invertebrados como bioindicadores y biomarcadores de calidad de agua, y diferentes ensayos de toxicidad (Ronco et al., 2004). El uso de bioindicadores se basa en el análisis de la alteración de las comunidades de los organismos que habitan diferentes ecosistemas frente a una determinada perturbación, integrando los cambios que sufrieron los ecosistemas a lo largo de una o varias generaciones. Se diferencian de los parámetros físico-químicos en que estos últimos, aportan principalmente información que es representativa de las condiciones momentáneas del agua.

Los bioindicadores también pueden aportar información de las perturbaciones más allá de la contaminación del agua, por ejemplo relacionadas a la alteración física del cauce y de la ribera (Ladrera Fernández, 2012).

Los invertebrados acuáticos conforman uno de los grupos de organismos mejor adaptados a los ambientes fluviales y son ampliamente utilizados como bioindicadores de calidad de aguas (Barbour et al., 1999; Bonada et al., 2006). Habitan en la mayoría de arroyos y ríos, exceptuando los que se encuentran muy contaminados. Su diversidad y densidad son generalmente muy elevadas incluyendo insectos, anélidos, moluscos, crustáceos, nematodos y platelmintos (Elosegui & Sabater, 2009). Constituyen el componente de biomasa animal más importante en ríos y lagunas, y tienen un rol fundamental en la transferencia de energía desde los recursos basales (algas, detrito, macrófitas) hacia los consumidores superiores de la red trófica (peces, aves acuáticas, mamíferos semiacuáticos) (Fernández, 2012). La ventaja de su empleo en el monitoreo ambiental radica en que presentan una gran distribución, tanto geográfica como en diferentes ambientes; su diversidad ofrece un gran espectro de respuestas ambientales; son especies con movilidad limitada y presentan ciclos de vida relativamente cortos por lo que reflejan con mayor rapidez las alteraciones del medio ambiente mediante cambios en la estructura de sus poblaciones y comunidades. Además, su taxonomía se encuentra bien descrita a nivel de género y familia, y los métodos de muestreo son sencillos y económicos (Barbour et al., 1999; Gamboa et al., 2008).

Los invertebrados son también muy utilizados en ensayos de ecotoxicidad. De acuerdo a Truhaut (1975), la ecotoxicología estudia los efectos tóxicos causados por sustancias naturales o contaminantes artificiales en organismos vivos, además de la interacción de estas sustancias con el entorno físico en el que viven estos organismos. Este tipo de ensayos son muy útiles como indicadores de relaciones entre efecto y exposición a los tóxicos, bajo condiciones definidas, controladas y reproducibles (Peluso, 2011). Los bioensayos son una importante herramienta de diagnóstico para el estudio del impacto de diversos contaminantes sobre la biota (Blaise, 2000; Burton & Landrum, 2003).

Existen diversos parámetros para evaluar la ecotoxicidad. Los efectos fisiológicos, reproductivos o de comportamiento son de utilidad, aunque el más difundido es la muerte del organismo de prueba. Los bioensayos implican una exposición a un compuesto de interés (e.g. pesticidas, metales pesados, contaminantes ambientales) el cual es aplicado a un

organismo sobre el que se evaluará una respuesta preseleccionada. Esa respuesta se valorará mediante la cuantificación de alguna característica (e.g. peso), el cambio en ella (e.g. aumento del peso) o la ocurrencia o no de un fenómeno determinado (e.g. muerte, inhibición de crecimiento) (Díaz Báez et al., 2004).

Entre los organismos más utilizados en estudios ecotoxicológicos, se encuentran los crustáceos representados mayormente por daphnias, artemias y anfípodos. Son organismos abundantes en ambientes acuáticos, con alta sensibilidad a diferentes compuestos tóxicos y además su cría y mantenimiento en laboratorio son relativamente sencillos. Estudios recientes sobre *Grammarus* sp. (Whitacre, 2010); *H. curvispina* (Giusto et al., 2014; Mugni et al., 2014; Peluso, 2011); *Hyaella azteca* (Saussure, 1858) y *Heterocypris incongruens* (De Cooman et al., 2015); *Daphnia magna* (Persoone et al., 2009) y *Artemia* sp. (Nunes et al., 2006), demuestran la utilidad de estos grupos en ensayos de ecotoxicidad.

En relación al uso de distintos organismos de prueba, *H. azteca*, distribuida en el hemisferio norte, es el anfípodo más utilizado en ensayos ecotoxicológicos principalmente en Estados Unidos y Canadá. Entre los primeros bioensayos, De March (1978) al analizar los efectos de diferentes temperaturas sobre el tamaño, crecimiento y reproducción de *H. azteca*, observó que se produjeron organismos grandes, intermedios y pequeños a temperaturas bajas, intermedias y altas, respectivamente. El tiempo de maduración fue mayor de lo esperado a temperaturas más bajas, y menor a temperaturas altas. Otros estudios ecotoxicológicos han comprobado efectos nocivos de diversos químicos en *H. azteca*, entre ellos, la alteración del desarrollo sexual y cambios morfológicos en respuesta a estrógenos (Vanderbergh et al., 2003) y alteraciones en la proporción de sexos ante la presencia de otros agentes farmacéuticos comunes (acetaminofén, diclofenac, gemfibrozilo, ibuprofeno, naproxeno, ácido salicílico y triclosán (Borgmann et al., 2007). Al estudiar el efecto de la ingestión de partículas microplásticos en *H. azteca*, Au y colaboradores (2015) observaron una mayor toxicidad de las fibras de polipropileno en relación a las de polietileno, afectando el crecimiento y la reproducción de los organismos. Este estudio destaca que *H. azteca* responde de manera diferencial a distintos compuestos tóxicos.

2.2 Organismo de estudio: *Hyaella curvispina*

El orden Amphipoda (Figura 1) comprende organismos que presentan numerosas formas de vida, pudiéndose encontrar epifaunales, de vida libre, excavadores, pelágicos o

comensales, ya sea en ambientes lóticos y lénticos de distintas dimensiones, en numerosos microhábitats desde fondos rocosos o arenosos, hasta asociados a vegetación acuática flotante o arraigada. Las macrófitas les proveen de alimento y refugio, además de actuar como sustrato para su desplazamiento en la columna de agua (Colla, 2015).

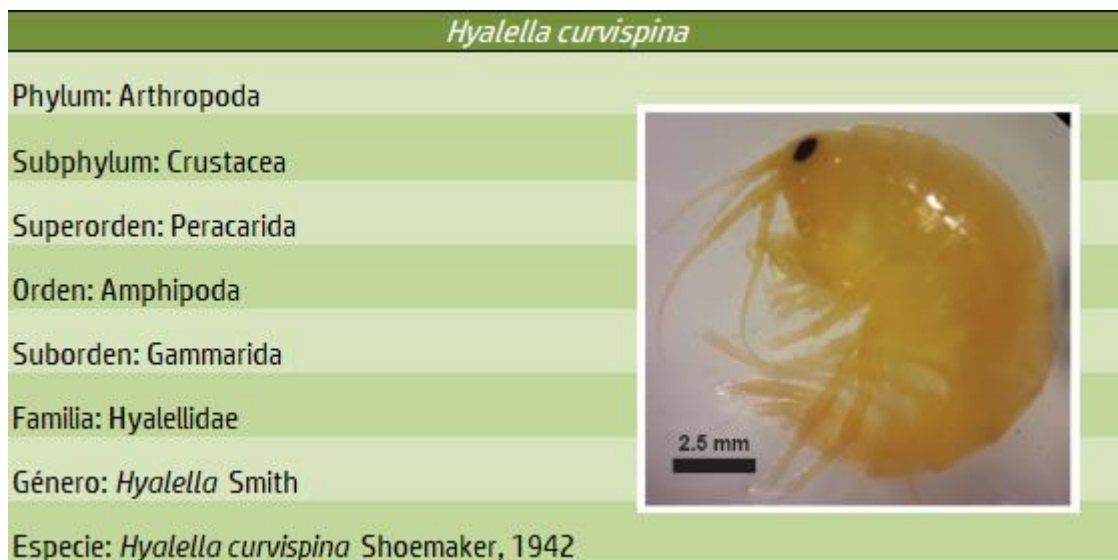


Figura 1. Clasificación taxonómica de *H. curvispina*.

En estos organismos se observa un apareamiento específico entre machos y hembras, caracterizado por un amplexo de varios días (Figura 2C). Durante este comportamiento, el macho se coloca sobre el dorso de la hembra, sujetándola con los gnatopodos, manteniéndose en esa posición hasta que la hembra muda (Colla, 2015). Los gnatopodos de los machos se encuentran más desarrollados que los de las hembras, marcando un dimorfismo sexual (Figura 2A-B). Durante la muda, los ovocitos son fertilizados en el marsupio, separándose luego el macho. Las hembras llevan esos huevos fertilizados en el marsupio durante su desarrollo (Figura 2D), para luego liberar los juveniles antes de su próxima muda.

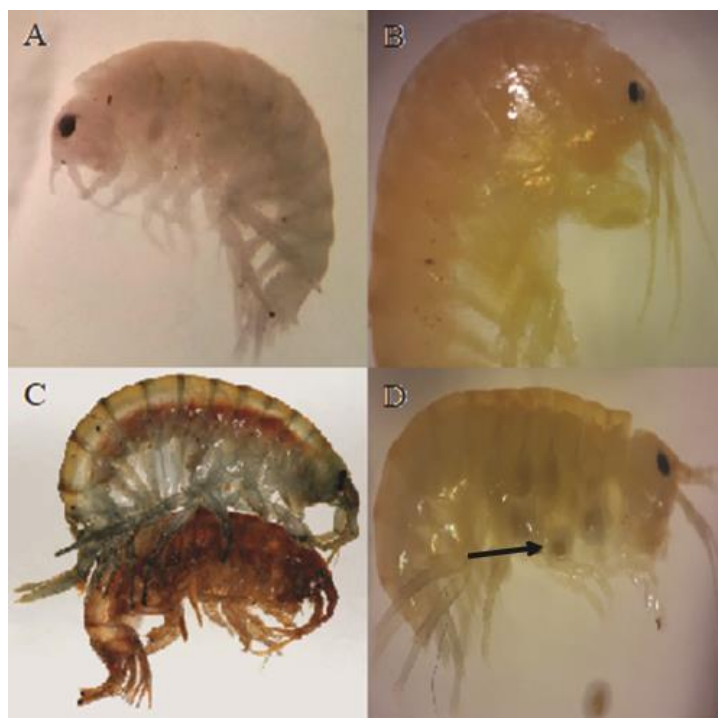


Figura 2. (A) Vista lateral de hembra de *H. curvispina*. (B) Vista lateral de macho de *H. curvispina*. (C) Amplexo. Fuente: Museo Nacional de Historia Natural https://www.mnhn.gob.cl/613/w3-article-52355.html?_noredirect=1 (D) Vista lateral de hembra con huevos en su marsupio. La flecha indica la ubicación de los huevos.

Dentro del orden Amphipoda, la familia Hyalellidae (Figura 1) es una familia de distribución exclusivamente americana con representantes en agua dulce y marinos (Väinölä et al. 2008). El género *Hyaella* (“Hyaellas”), es el único que comprende especies de agua dulce y cuenta con más de 60 especies, 50 de las cuales son sudamericanas (Saigo et al., 2009). La especie *H. curvispina* se distribuye desde Perú hasta el sur de Chile e Islas Malvinas (García, 2009) y es frecuente en ambientes lóticos como ríos y arroyos, y lénticos, como charcas, lagunas y costa de lagos. Son individuos aplanados lateralmente y pequeños de 2 a 40 mm en el estadio adulto, que frecuentemente se encuentran asociados a vegetación acuática (Somma et al., 2011).

2.3 El uso de *Hyaella curvispina* en Argentina

La utilización de especies adaptadas a las características ambientales de los sitios bajo estudio podría brindar resultados más exactos y que describan mejor las condiciones locales,

que los obtenidos a partir de especies exóticas. Con este propósito, se ha extendido el uso de *H. curvispina* dado que presenta un rango de distribución muy amplio en América del Sur. En nuestro país, esta especie está siendo muy utilizada en diferentes bioensayos para evaluar la toxicidad de contaminantes que afectan a la región pampeana. García y colaboradores (2010), demostraron el efecto tóxico del cadmio en tres etapas de desarrollo de *H. curvispina*, siendo todas las etapas altamente susceptibles al mismo, pero con mayor sensibilidad en neonatos y adultos que en juveniles. Otro estudio comprobó que altas concentraciones de Cr^{+6} y Zn^{+2} en el sedimento alteraron significativamente el crecimiento de individuos de *H. curvispina* (Peluso et al., 2011).

La toxicidad ejercida por pesticidas para *H. curvispina* en la escorrentía y el flujo de agua dentro de una granja de soja en Buenos Aires fue analizada por Mugni y colaboradores (2011), quienes observaron pulsos de toxicidad efímera como consecuencia de la aplicación de pesticidas tales como cipermetrina, clorpirifos, endosulfán y glifosato. Resultados similares fueron descriptos también en la provincia de Buenos Aires, por Jergentz y colaboradores (2004), quienes mostraron la presencia de pulsos de toxicidad en corrientes que drenan cuencas cultivadas intensamente, asociados a la presencia de los mismos compuestos.

H. curvispina también fue utilizada para evaluar la ecotoxicidad de muestras de sedimentos del arroyo poluido La Chozza (Buenos Aires) por Giusto y colaboradores (2014). Mediante el análisis de longitud y biomasa de las hyalellas observaron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento, y un aumento de estrés oxidativo y las defensas antioxidantes en aquellos organismos expuestos a sedimentos del arroyo contaminado en relación a los sedimentos de referencia.

2.4 Antecedentes en Patagonia

Los estudios realizados con *H. curvispina* en Patagonia se limitan a trabajos realizados en la zona del valle de Río Negro y Neuquén, en donde se ha estudiado principalmente el efecto toxicológico de distintos pesticidas sobre este organismo. En este sentido, Anguiano y colaboradores (2014), estudiaron la toxicidad de un pesticida organofosforado en *H. curvispina* en la zona de los Ríos Limay, Neuquén y Negro, detectando la existencia de dos subpoblaciones con diferentes susceptibilidades al mismo. En otro estudio, se observó que los organismos del sitio de referencia expuestos a

concentraciones bajas de carbarilo presentaban alteraciones en la natación, mientras que frente a concentraciones altas se observaban movimientos intermitentes de los pleópodos antes de la muerte. Los organismos provenientes del sitio con exposición a pesticidas, mostraban hiperactividad en concentraciones bajas, e inmovilidad con escaso movimiento de pleópodos en concentraciones altas (Anguiano et al., 2017).

Del Brio y colaboradores (2018), realizaron estudios con *H. curvispina* en Neuquén para demostrar toxicidad con hidrocarburos. Los anfípodos provenían de sitios con y sin contaminación. Aquellos provenientes del sitio de referencia fueron altamente sensibles en comparación con los que habitaban en zonas urbanas con contaminación, quienes además lograron sobrevivir a exposiciones de WAF (petróleo crudo en una fracción de aceite acomodada en agua) puro.

Hasta el momento, no se han explorado exhaustivamente los efectos de la salinidad y el amonio utilizando a *H. curvispina* como organismo de prueba.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la utilización del anfípodo de agua dulce *Hyaella curvispina* en bioensayos para estudiar el efecto de contaminantes de ambientes acuáticos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar las condiciones de mantenimiento en el laboratorio de *H. curvispina* obtenida de nuestra región como organismo de prueba para el estudio de efectos biológicos de contaminantes del agua.
- Evaluar los efectos de la salinidad utilizando distintas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) sobre la sobrevivencia, formación de amplexos y sensibilidad según la talla de *H. curvispina*.
- Evaluar los efectos tóxicos de distintas concentraciones de cloruro de amonio (NH₄Cl) sobre la sobrevivencia, formación de amplexos y sensibilidad según la talla de *H. curvispina*.
- Evaluar el efecto de diferentes muestras de agua (tomadas a campo) con distintos valores de conductividad y contenido de amonio sobre la sobrevivencia, formación de amplexos y sensibilidad según la talla de *H. curvispina*.

4. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS GENERAL:

- El anfípodo nativo de agua dulce *Hyaella curvispina* es apto para su utilización en bioensayos para la evaluación de efectos tóxicos de contaminantes acuáticos.

HIPÓTESIS ESPECÍFICAS:

- Los ejemplares de *H. curvispina* obtenidos en ambientes de nuestra región son capaces de mantenerse y desarrollarse en las condiciones locales de laboratorio.
- El cloruro de amonio y el cloruro de sodio (salinidad) tienen efectos tóxicos sobre *H. curvispina* y éstos se incrementan a mayores concentraciones.
- Las aguas provenientes de sitios con elevado contenido de amonio y alta conductividad tienen efectos tóxicos sobre *H. curvispina*, en relación a otras aguas provenientes de sitios con valores más bajos de éstos parámetros.
- Los efectos tóxicos se evidencian como una disminución de la sobrevivencia y de la reproducción (formación de amplexos), como así también en una sensibilidad diferencial en relación a la talla.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Obtención de los organismos en campo

Los organismos fueron recolectados en la Reserva Natural Urbana (RNU) Laguna La Zeta, ubicada a 5 km de la ciudad de Esquel, Provincia del Chubut (Figura 3). Esta laguna cuenta con seis ambientes diferentes: laguna, juncal, mallín, estepa, zona de arbustos y zona arbórea, en donde se ha registrado zooplancton, invertebrados acuáticos, y cordados (peces, anfibios, reptiles, aves, y mamíferos) (Araqué, 2015; Szulkin, 2003).

En la laguna se observan especies arbóreas, arbustivas y graminosas típicas de un ambiente ecotonal, alternando con forestaciones de coníferas exóticas y la presencia de sauces y herbáceas exóticas (Szulkin, 2003). Para la comunidad de macrófitas se han citado 33 especies, representando una gran importancia en los sistemas dulceacuícolas ya que son productoras primarias que actúan como hábitat y proveen de alimento a diversos organismos, entre ellos *H. curvispina* que representa el modelo de estudio del presente trabajo (Martínez Peck, 1994; Zuloaga et al., 2008).



Figura 3. Imagen de la ubicación geográfica de la Reserva Natural Urbana Laguna La Zeta. La imagen ampliada muestra el sitio de recolección de *H. curvispina*.

La recolección de los organismos se llevó a cabo en sectores con macrófitas y juncos de las márgenes de la laguna utilizando una red de marco D con 500 μm de poro para macroinvertebrados. Una vez recolectados, fueron llevados al laboratorio en agua de la laguna.

En el laboratorio se realizó el proceso de aclimatación, el cual consistió en reemplazar paulatinamente la totalidad el agua del sitio de colecta por agua no clorada obtenida de la vertiente. Esta etapa es imprescindible para asegurar la sobrevivencia de los organismos al pasar de su medio natural a las condiciones experimentales (Somma et al., 2011). Una vez realizado el proceso de aclimatación, el material se colocó en una batea donde fueron separados cuidadosamente los individuos para el ensayo de los demás organismos capturados y del material orgánico, utilizando pipetas Pasteur plásticas de boca ancha, para evitar generar algún daño a los organismos durante el procedimiento (Figura 4).

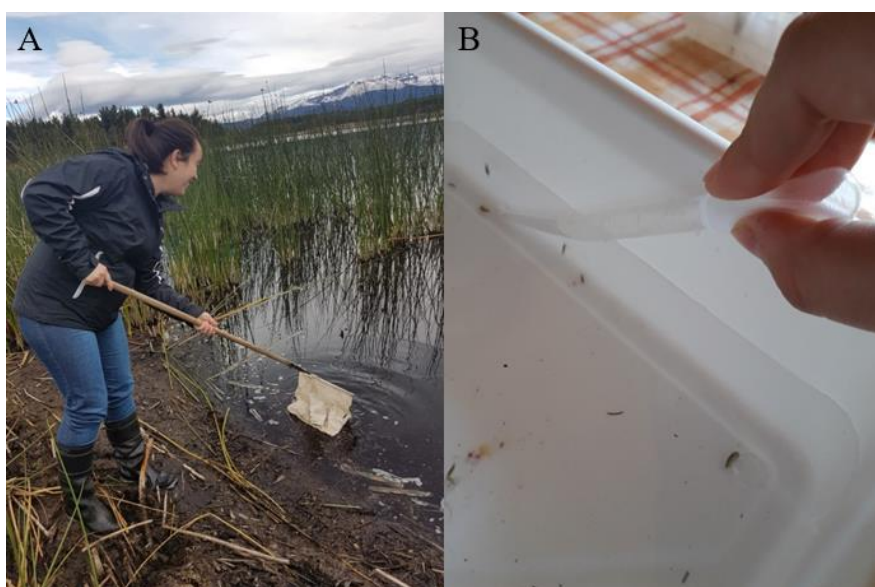


Figura 4. (A) Extracción de hyalellas en márgenes de la laguna con red de marco D. (B) Separación manual de los organismos de prueba en el laboratorio.

5.2 Obtención de agua para ensayos

El sistema hídrico Esquel-Percy pertenece a la cuenca del Futaleufú-Yelcho, que drena hacia el pacífico a través del Río Yelcho (Chile). En su tramo medio recibe los efluentes cloacales de la ciudad de Esquel. Cuenta con dos periodos de flujos máximos, uno durante el invierno debido a las abundantes precipitaciones y otro coincidente con el deshielo en primavera (Miserendino, 1995).

El agua para la aclimatación de los organismos, las pruebas de mantenimiento en laboratorio y los ensayos de salinidad y amonio se obtuvo de un manantial que emerge de las laderas del Cerro La Hoya, aproximadamente a 8 km de la ciudad de Esquel y se obtiene a través de una obra de captación de agua para uso público (Figura 5).



Figura 5. Ubicación geográfica de la vertiente de agua utilizada para los ensayos.

Este agua de manantial es considerada oligotrófica, presenta valores bajos de conductividad ($92 \mu\text{S}/\text{cm}$); homogeneidad de cationes, siendo el Ca^{2+} el dominante; concentraciones de sales inferiores a $100 \text{ mg}/\text{l}$; valores extremadamente bajos de nutrientes, principalmente de nitratos y nitritos. Los análisis bacteriológicos realizados por Kusch (2018) mostraron una detección casi nula de bacterias coliformes totales, bacterias coliformes fecales y la bacteria *Escherichia coli* (Escherich, 1885).

Para evaluar posibles efectos de toxicidad del agua proveniente de sitios de nuestra región, se utilizaron muestras de agua de tres puntos de muestreo sobre el Arroyo Esquel que presentan diferente grado de contaminación urbana determinado en estudios ecológicos previos (Brand et al., 2018; Miserendino et al., 2008). El punto de muestreo “Esquel Arriba”, presenta el menor grado de disturbio, siendo un área de referencia. “Esquel Matadero” presenta un grado de contaminación medio, es un sitio que presenta contaminación antrópica propia de la ciudad debido a que se encuentra afectado por el descarte de basura y descargas cloacales domiciliarias puntuales. “Esquel Post-PTLC (Planta de Tratamiento de Líquidos

Cloacales)” es el sitio con mayor contaminación como consecuencia del vertido de los efluentes finales de la PTLC de la ciudad de Esquel (Figura 6).



Figura 6. Ubicación e imágenes de los puntos de muestreo del Arroyo Esquel y de la PTLC.

5.3 Análisis físico-químicos del agua

En cada uno de los sitios de colecta de agua, se registraron las principales características físico-químicas: temperatura del agua (°C), conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$), salinidad (%), pH, concentración de oxígeno disuelto (mg/l) y % saturación, utilizando una sonda multiparamétrica (Hach, modelo HQ40D).

Los análisis de nutrientes se realizaron en el laboratorio del Centro de Investigación Esquel de Montaña y Estepa Patagónica (CIEMEP, CONICET-UNPSJB) siguiendo los métodos de análisis colorimétricos establecidos por la Asociación de Salud Pública Americana (American Public Health Association, APHA (1994). Brevemente, para la determinación de fosfatos solubles se utilizó el método de reducción del ácido ascórbico, con previa digestión ácida. El molibdato de amonio y el tartrato de antimonio y potasio reaccionan en medio ácido con el ion ortofosfato para formar un compuesto que se reduce por el ácido ascórbico a un complejo azul de molibdeno, intensamente coloreado que absorbe a λ 885 nm. La concentración de fosfatos solubles se expresó como P-PO_4 en $\mu\text{g}/\text{l}$ (μg de P

medido como PO_4 por litro de agua). El amonio se determinó utilizando el método del azul de indofenol. El fenol alcalino y el hipoclorito de sodio reaccionan con el ion amonio para formar el compuesto azul de indofenol cuyo color es intensificado por adición de nitroprusiato de sodio y se determina a λ 635 nm. El resultado se expresó como μg de N en forma de NH_4 (N- NH_4). Para la determinación de nitritos + nitratos se utilizó el método de reducción con sulfato de hidracina (λ 543 nm) y se expresó como N en forma de NO_3 en $\mu\text{g}/\text{l}$ (N- NO_3). En cada caso se preparó una curva de calibración utilizando sustancias patrón de concentración conocida, cuyas absorbancias fueron leídas junto a las muestras en espectrofotómetro (Biotraza 752 UV-visible) a la longitud de onda correspondiente.

5.4 Variables de respuesta

En todos los ensayos se determinaron parámetros comúnmente utilizados en pruebas ecotoxicológicas como variables de respuesta:

- Sobrevida: número de individuos sobrevivientes en cada tiempo expresado como porcentaje del total.
- Peso seco (PS): peso seco promedio de los individuos muertos durante el ensayo en cada tiempo y los remanentes al final del mismo. Los grupos de individuos fueron fijados en alcohol 70 %, posteriormente secados en estufa (65 °C, 24 h) y pesados en balanza analítica.
- Parámetros reproductivos: número de amplexos. Los amplexos son claramente identificables a simple vista. En cada día de registro se determinó la presencia/ausencia de los mismos.

5.5 Prueba de mantenimiento de *Hyalella curvispina* en laboratorio y puesta a punto de los ensayos

Para determinar las condiciones óptimas de mantenimiento en el laboratorio de *H. curvispina* se siguió la metodología general propuesta por Peluso y colaboradores (2011) y Somma y colaboradores (2011). Se prepararon cuatro frascos de vidrio (3 l de capacidad) conteniendo 35 individuos cada uno, en 1 l de agua limpia, una roca (12 x 6 cm aprox.) extraída del sitio y una planta acuática (*Veronica anagallis-aquatica* L.) previamente descontaminados con azul de metileno, ya que sirven de refugio a las hyalellas (Figura 7). Se realizaron tres réplicas por tratamiento (n=3), entre los meses de enero y febrero de 2019. Las

pruebas se realizaron en el laboratorio con un fotoperiodo natural y a temperatura ambiente registrando los datos con un termógrafo ($18,6 \pm 2,1$ °C). Se analizó el efecto de la presencia/ausencia de aireación y de plantas acuáticas las cuales sirven de refugio y alimento, como así también contribuyen a la aireación del medio. Los frascos presentaban las siguientes características:

- Tratamiento 1: Con plantas acuáticas y con aireador.
- Tratamiento 2: Sin plantas acuáticas y con aireador.
- Tratamiento 3: Con plantas acuáticas y sin aireador.
- Tratamiento 4: Sin plantas acuáticas y sin aireador.

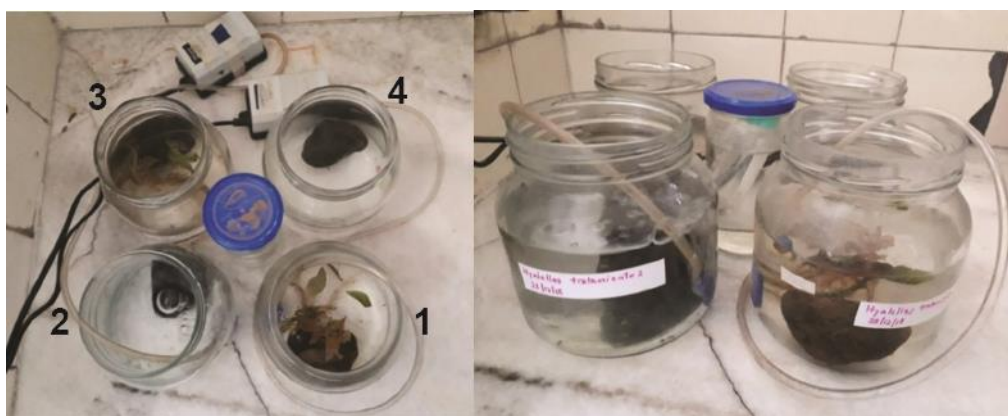


Figura 7. Ensayo representativo para evaluar las condiciones óptimas de mantenimiento de *H. curvispina* en el laboratorio. Los números indican los tratamientos mencionados en el texto.

Durante los siguientes 14 días, se realizó un seguimiento día por medio de los organismos, suministrándoles a todos los tratamientos alimento *ad libitum* para peces en escamas (VitaFish®) y realizando un cambio parcial del agua (50 % de agua limpia). Además, para cada tratamiento se registró si se formaban o no amplexos. Se estimó el PS de los organismos muertos en cada oportunidad.

Para establecer el efecto del aireador en la concentración efectiva de amonio, se realizó la medición de los niveles de amonio en una solución de prueba de 5 mg/l de NH_4Cl mantenida en presencia y ausencia de oxígeno por 72 h.

En base a estos resultados se determinaron las condiciones óptimas para el mantenimiento de *H. curvispina* en el laboratorio que fueron utilizadas en los ensayos posteriores.

5.6 Ensayos de toxicidad

Se evaluaron los efectos de dos parámetros frecuentemente alterados en los ecosistemas acuáticos debido a las actividades humanas: la salinidad (en términos de NaCl) y el amonio (como NH₄Cl). En ambos casos se analizaron diferentes concentraciones en forma individual contemplando que abarquen el rango observado en ambientes de la región con distintos grados de disturbio (Assef et al., 2014, 2019; Horak et al., 2019; Miserendino et al., 2008, 2011). Además se evaluó el efecto de muestras de agua de la zona con distintos valores de conductividad y contenido de amonio.

5.6.1 Bioensayos con NaCl

Se prepararon siete frascos de vidrio (350 ml de capacidad), conteniendo 15 individuos cada uno, donde se colocaron 250 ml de agua limpia, una roca extraída del sitio y una planta acuática (*Veronica anagallis-aquatica* L.). Se realizaron tres réplicas por tratamiento (n=3) entre abril y mayo de 2019. Las pruebas se llevaron a cabo en el laboratorio con un fotoperiodo natural y a temperatura ambiente registrando los datos con un termógrafo ($16,4 \pm 0,6$ °C). Se analizaron seis concentraciones diferentes: 0,01; 0,1; 0,25; 0,50; 1 y 10 g/l. Además, cada ensayo contó con un grupo control sin tratar (0 g/l) (Figura 8). Se realizaron mediciones día por medio, evaluándose las variables respuesta antes mencionadas, en las diferentes concentraciones de NaCl, por 14 días. En cada control, se midió la conductividad del agua de cada tratamiento utilizando una sonda multiparamétrica.



Figura 8. Recipiente preparado para los ensayos de salinidad A modo representativo se muestra un frasco control conteniendo el agua, roca, planta acuática y los organismos de prueba.

5.6.2 Bioensayos con NH_4Cl

Se prepararon cinco frascos de vidrio (350 ml de capacidad), conteniendo 15 individuos cada uno, donde se colocaron 250 ml de agua limpia, una roca extraída del sitio y una planta acuática (*Veronica anagallis-aquatica* L.). Se realizaron tres réplicas por tratamiento ($n=3$) durante el mes de junio de 2019. Las pruebas se llevaron a cabo en el laboratorio con un fotoperiodo natural y a temperatura ambiente registrando los datos con un termógrafo ($15,6 \pm 1,6$ °C). Se analizaron cuatro concentraciones diferentes de NH_4Cl : 5; 10; 15 y 30 mg/l. Además, cada ensayo contó con un grupo control sin tratar (0 mg/l) (Figura 9). Se realizaron controles día por medio, donde se evaluó la respuesta de las variables antes mencionadas en las diferentes concentraciones de NH_4Cl , por 14 días.



Figura 9. Ensayos para evaluar la toxicidad del NH_4Cl sobre *H. curvispina*.

5.6.3 Bioensayos con agua contaminada

Se evaluó la toxicidad del agua proveniente de tres puntos del Arroyo Esquel que presentan diferente grado de disturbio, sobre *H. curvispina*. Se utilizaron tres frascos de vidrio (350 ml de capacidad), conteniendo 15 individuos cada uno, donde se colocaron 250 ml de agua de cada sitio, una roca y una planta acuática (*Veronica anagallis-aquatica* L.). Se realizaron cinco réplicas por tratamiento ($n=5$) entre los meses de octubre y diciembre de 2019. Las pruebas se llevaron a cabo en el laboratorio con un fotoperiodo natural y a temperatura ambiente registrando los datos con un termógrafo ($16,8 \pm 1,5$ °C). (Figura 10). Día por medio, se realizaron controles donde se evaluó la respuesta de las variables antes mencionadas luego de la exposición a las diferentes muestras de agua por 14 días.



Figura 10. Ensayos para evaluar la toxicidad de aguas provenientes del Arroyo Esquel.

5.7 Análisis de datos

Tanto para las pruebas de mantenimiento en laboratorio, como para los ensayos de toxicidad, los resultados de sobrevivencia fueron expresados como la media \pm desvío estándar de las réplicas para cada día de registro (durante los 14 días de ensayo). Se consideró como n, al número de réplicas y hace referencia a ensayos independientes.

La concentración letal 50 (CL50, concentración del tóxico que produce la muerte del 50 % de los organismos), fue estimada a partir de los datos de sobrevivencia. Para ello, se construyeron gráficos del % de sobrevivencia en función de la concentración de NaCl o NH₄Cl y la curva obtenida se ajustó a una función sigmoidea utilizando el software Sigma Plot 11.0. Este procedimiento fue realizado a diferentes tiempos de exposición (48 h, 7 y 14 d) para determinar el tiempo que permite estimar mejor este parámetro.

Para establecer si existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) bifactorial con interacción con bloques para el ensayo de aclimatación y puesta a punto, donde la variable dependiente fue la sobrevivencia, mientras que los factores de interés fueron: planta y aire. Para los ensayos de toxicidad se realizó un análisis bifactorial con interacción con medidas repetidas, donde la variable dependiente fue la sobrevivencia mientras que los factores de interés (en los tres ensayos) fueron tratamiento y tiempo. Para todos los análisis se utilizó el software InfoStat (Di Rienzo et al., 2020), considerando diferencias significativas cuando el $p < 0,05$. En caso de hallar

diferencias significativas se utilizó el Test a posteriori de Tukey para poder separar los grupos.

6. RESULTADOS

6.1 Prueba de mantenimiento de *Hyalella curvispina* en laboratorio y puesta a punto de los ensayos

Se evaluó la respuesta de *H. curvispina* en cuanto a presencia de plantas acuáticas (*V. anagallis-aquatica* L.) y/o aireación en el medio para determinar las condiciones óptimas de su mantenimiento en el laboratorio (Figura 11). La mayor sobrevivencia se obtuvo al exponer a las hyalellas a los tratamientos 1 (+aireación/+ planta) y 3 (-aireación/+planta), donde los valores obtenidos en el día 14 fueron de 72,3 y 61,9 %, respectivamente. Si bien al comparar los resultados de estos dos últimos tratamientos se observó una diferencia en cuanto a la sobrevivencia, ésta no resultó estadísticamente significativa ($n=3$, $p=0,4414$ correspondiente al día 14) (Figura 12 y Anexo). Los menores niveles de sobrevivencia se observaron en los tratamientos 2 (+aireación/-planta) y 4 (-aireación/-planta), con valores de 36,2 % y 19,0 %, respectivamente. Se determinó que la presencia de la planta, otorgaba mejores condiciones de vida para las hyalellas ($p=0,0006$, Ver Anexo), ya que al finalizar el ensayo presentó una sobrevivencia media mayor (67,15, Test de Tukey) difiriendo significativamente de aquellos ensayos donde la planta estaba ausente, donde se observó una sobrevivencia media menor (29,05, Test de Tukey). En base a estos resultados, se eligió este método de mantenimiento.

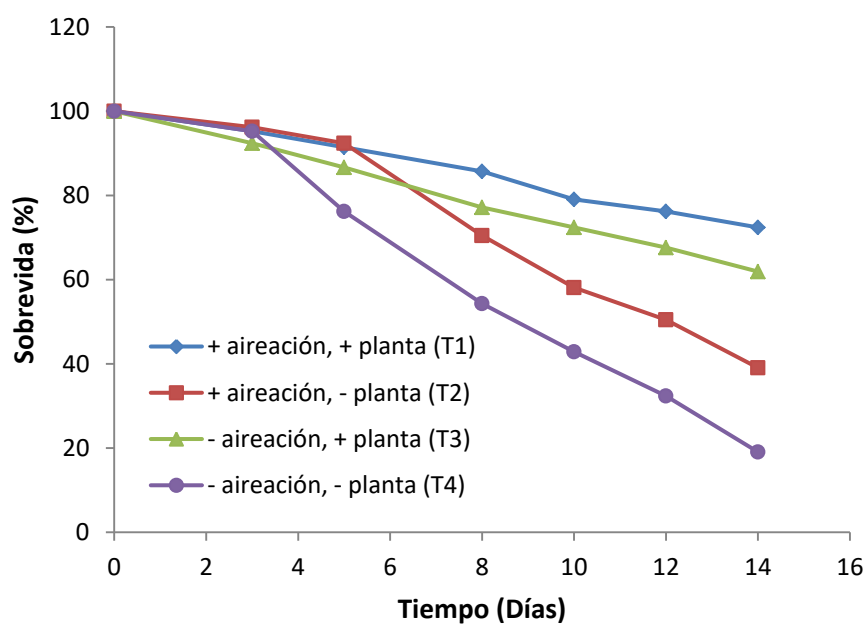


Figura 11. Porcentaje de sobrevivencia de *H. curvispina* en función del tiempo para las diferentes condiciones de mantenimiento en laboratorio.

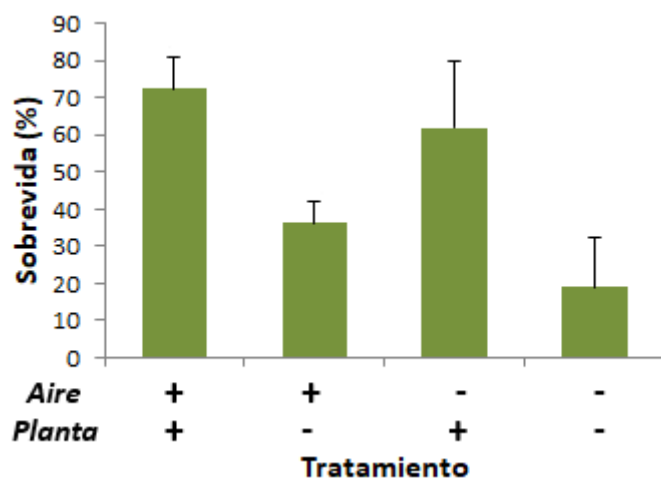


Figura 12. Respuesta de la sobrevivencia de *H. curvispina* a cada uno de los tratamientos al día 14 de tratamiento.

En cuanto al efecto del aireador, se detectó un efecto significativo del aire en la sobrevivencia de las hyalellas ($p= 0,0386$, Ver anexo). La ausencia de aireador presentó un valor de sobrevivencia media menor (65,72, Test de Tukey), difiriendo significativamente de la presencia de aireador, el cual presentó una sobrevivencia media mayor (78,10, Test de Tukey).

Se realizó la medición efectiva de la concentración de amonio en las soluciones de prueba en presencia y ausencia de oxígeno, y se observó una disminución de la concentración de amonio (~27 %) en condiciones de aireación por 72 h en relación a la condición inicial, posiblemente como consecuencia de procesos de oxidación (Figura 13). A pesar de que el aireador otorgaba un mayor valor de sobrevivencia, pero afectaba negativamente la concentración de amonio, los ensayos subsiguientes se realizaron en presencia de plantas acuáticas pero sin oxigenación.

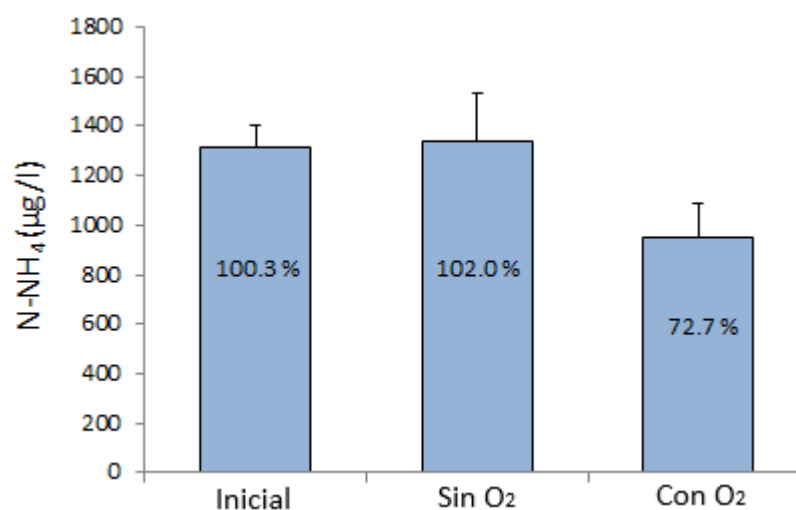


Figura 13. Prueba para evaluar la estabilidad de una solución acuosa de NH₄Cl luego de 72 h de oxigenación. El porcentaje de N-NH₄ en relación a la concentración teórica inicial se indica en el interior de la barra (n=2).

Los resultados del peso seco promedio de los organismos, al finalizar estos ensayos de puesta a punto se muestran en la Figura 14. No se observó una tendencia marcada de muerte según el peso para ninguna de las condiciones en los 14 días de ensayo.

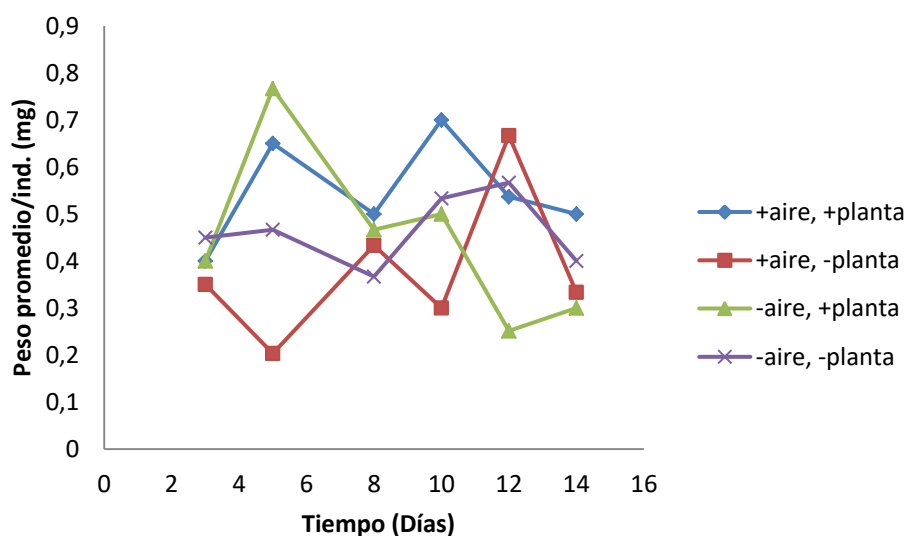


Figura 14. Peso seco promedio por individuo muerto registrado día por medio durante los 14 días de ensayo (n=3).

Durante estos ensayos se observó la formación de amplexos en algunos tratamientos (Figura 15). A las 48 h del ensayo, el número de amplexos registrados fue bajo para todas las condiciones de mantenimiento, presentando valores promedios de 1,3 amplexos para el tratamiento 1 (+aire/+planta), 0,7 para los tratamientos 2 y 3 (+aire/-planta y -aire/+planta) y 0,3 para el tratamiento 4 (-aire/-planta). Hacia el día 8, el número de amplexos se mantuvo igual para los tratamientos 2 y 4, mientras que para los tratamientos 1 y 3 aumentó, observándose valores de 2,3 y 2,7 respectivamente. En el día final del ensayo, el número de amplexos aumentó ~50 % en los tratamientos 1 y 3 con valores de 4,3 y 4,7 respectivamente. El tratamiento 2 presentó valores de 1,0 mientras que en el tratamiento 4 permaneció sin cambios.

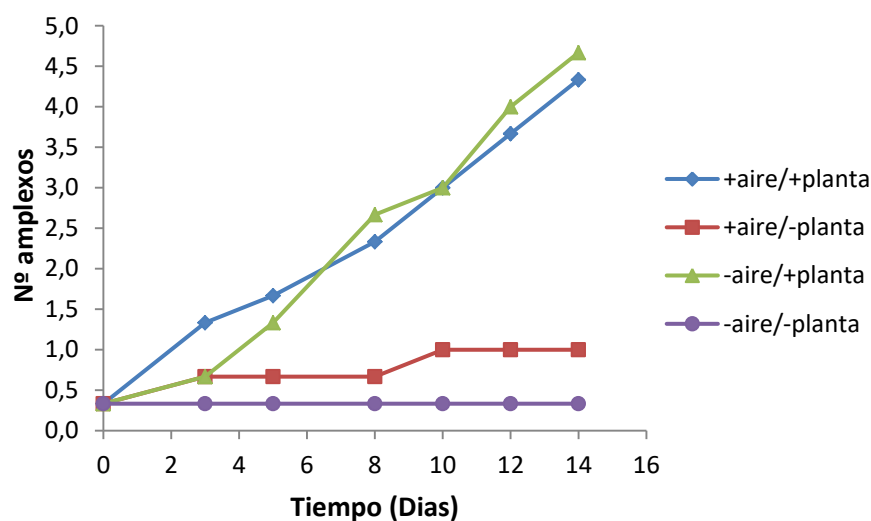


Figura 15. Número de amplexos registrados día por medio, durante 14 días de prueba bajo las diferentes condiciones de mantenimiento.

Tal como se había descrito en los resultados anteriores, los tratamientos que contaban con la presencia de la planta acuática (tratamientos 1 y 3) también fueron los más adecuados para el mantenimiento de los organismos en términos de variables reproductivas. Por esta razón, estas fueron las condiciones que se utilizaron en los ensayos subsiguientes.

6.2 Ensayos de toxicidad

6.2.1 Bioensayos con NaCl

Las hyalellas fueron expuestas a diferentes niveles de salinidad obtenidos a partir de soluciones con distintas concentraciones de NaCl entre 0 y 10 g/l. El total de sólidos disueltos (TDS) y la conductividad de los medios fueron medidos durante los 14 días de ensayo para todos los tratamientos con NaCl y los resultados promedio se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores promedio y desvío estándar (SD) de conductividad y TDS de las soluciones del ensayo de exposición a concentraciones crecientes de NaCl.

NaCl (g/l)	Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)		TDS (mg/l)	
	Promedio	SD	Promedio	SD
0	144,6	38,7	80,6	20,8
0,01	147,7	11,5	82,8	5,9
0,1	319,7	50	181,8	26,5
0,25	635	23,8	372,3	11,1
0,5	978	34,5	580,5	14,9
1	1760,4	387,9	1051,3	222,6
10	14618,3	3725,9	9886,7	2447,1

La sobrevida de las hyalellas que fueron expuestas a NaCl disminuyó en las concentraciones más elevadas y a mayores tiempos de exposición. Luego de 48 horas de exposición, la sobrevida en los primeros seis tratamientos superó el 90 %, mientras que se observó una disminución significativa en la concentración más alta (10 g/l), donde la sobrevida promedio fue de 47,9 % (Figura 16).

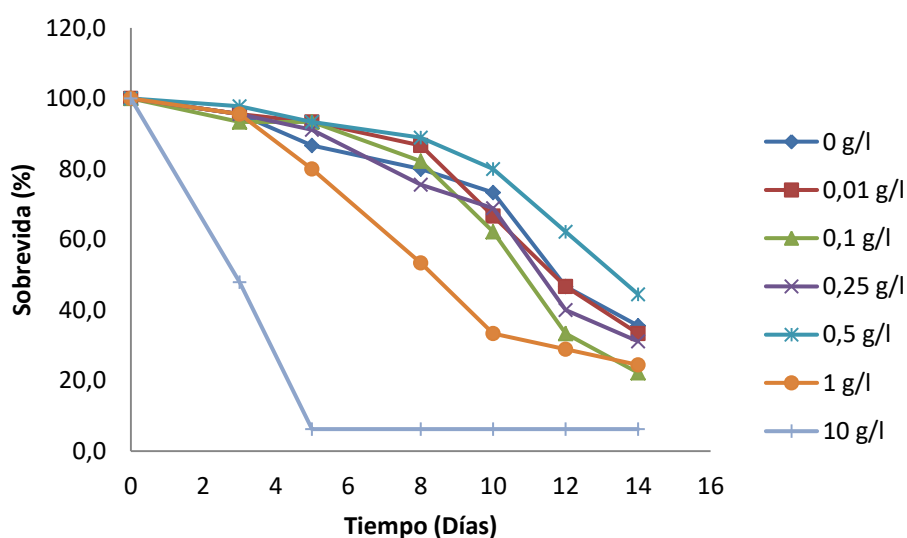


Figura 16. Porcentaje de sobrevida de *H. curvispina* en función del tiempo para las diferentes concentraciones de NaCl.

Para el día 8 las concentraciones más bajas (0,01; 0,1; 0,25; y 0,5 g/l) superaron el 75 % de sobrevida, presentando diferencias significativas con la concentración más alta (10 g/l),

donde la sobrevida fue de 6,3 %. La sobrevida para la concentración de 1 g/l disminuyó a 53,3 %. En el día 14, correspondiente al final del ensayo, se registró una elevada mortalidad para todas las concentraciones con porcentajes de sobrevida entre 22,2 y 44,4 %, mientras que para la máxima concentración de NaCl se mantuvo en 6,3 % (Figura 16).

Se detectó un efecto significativo de la interacción de los factores tratamiento (concentraciones de NaCl) y tiempo en la variable sobrevida ($p= 0,0087$). El tratamiento de mayor concentración (10 g/l) en las primeras 48 h y el día 14, presentó valores de sobrevida medios menores (6,27 en ambos tiempos, Test de Tukey) y difirió significativamente del grupo conformado por los niveles 0,5 g/l del día 8, y 0,1; 1; 0,25; 0,01 y 0,5 g/l de las 48 h, los cuales presentaron una sobrevida media mayor (entre 88,87 y 97,77, Test de Tukey) (Ver anexo).

Los porcentajes de sobrevida de las hyalellas en tres tiempos diferentes (48 h, 8 y 14 días), se representaron en gráficos concentración-respuesta para NaCl. Los resultados de los ensayos luego de 8 días de exposición fueron los únicos que permitieron el ajuste a una curva de concentración-respuesta de tipo sigmoidea (Figura 17), obteniéndose un valor de CL50 promedio de 0,98 g/l de NaCl.

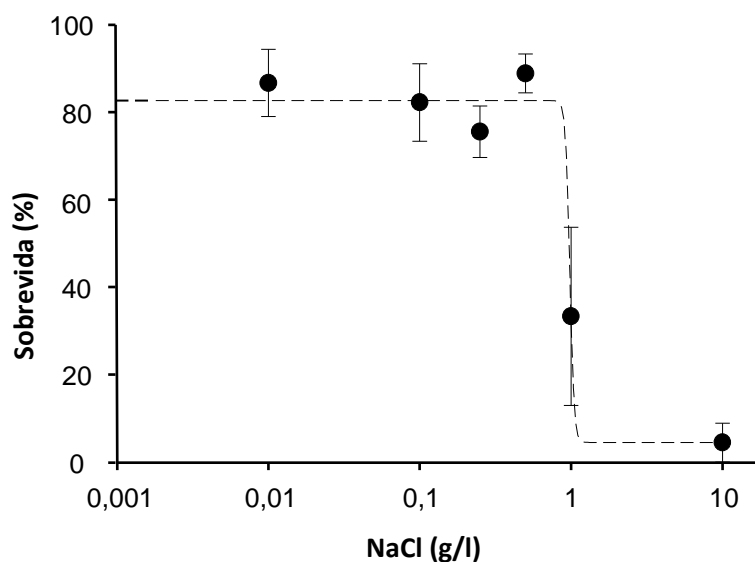


Figura 17. Curva de concentración-respuesta para *H. curvispina* a los 8 días de exposición para NaCl. El valor de CL50 obtenido fue de 0,98 g/l.

Los resultados del peso seco promedio de los organismos al finalizar estos ensayos de salinidad se muestran en la Figura 18. No se observó una tendencia marcada de muerte según el peso para ninguna de las concentraciones en los 14 días de ensayo. Además, en estos ensayos no se observó la formación de amplexos.

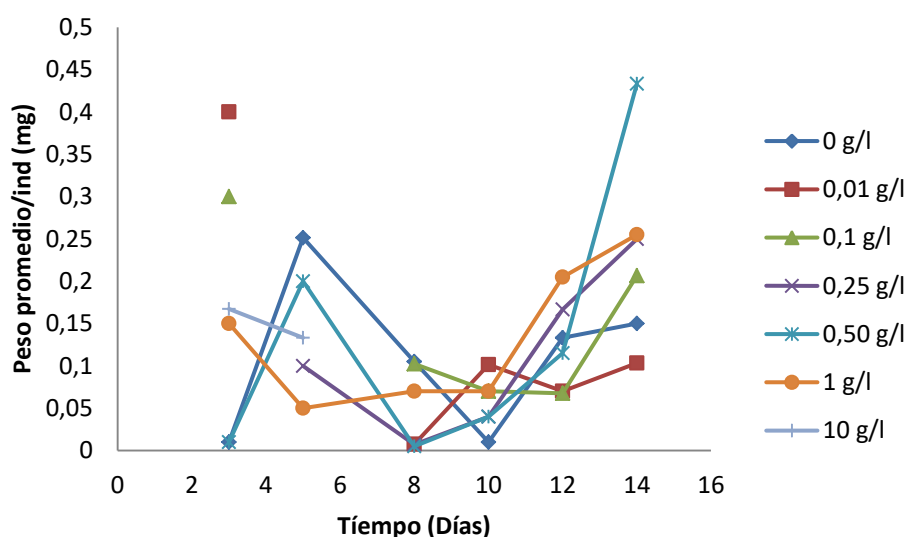


Figura 18. Peso seco promedio por individuo muerto, registrado día por medio durante los 14 días de ensayo.

6.2.2 Bioensayos con NH_4Cl

Las hyalellas fueron expuestas a diferentes concentraciones de NH_4Cl durante 14 días. Se registraron los valores de conductividad de las soluciones para evaluar su contribución en los efectos observados, especialmente a las concentraciones de amonio más elevadas (Tabla 2).

Tabla 2. Valores promedio de conductividad y desvío estándar (SD) de las soluciones de NH_4Cl

NH_4Cl (mg/l)	Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)		TDS (mg/l)	
	Promedio	SD	Promedio	SD
0	83,6	5,2	140,8	10,1
5	96,5	4,3	160,4	7,1
10	132,4	6,2	219,1	9,9
15	162,6	2,9	266,0	4,4
30	257,7	3,5	417,3	6,0

La sobrevida de las hyalellas que fueron expuestas a soluciones de NH_4Cl disminuyó en las concentraciones más elevadas y a mayor tiempo de exposición. Durante las primeras 48 h de ensayo, la sobrevida promedio registrada fue del 100 % en el control y en la concentración más baja (5 mg/l), mientras que disminuyó un ~20 % para el resto de las concentraciones. Para el día 8, la mayor sobrevida se registró en el control (0 mg/l) y en la concentración de 5 mg/l con 93,3 y 97,8 %, respectivamente. Los porcentajes descendieron a 64,4 y 66,7 % para las concentraciones de 10 y 15 mg/l, respectivamente, siendo a su vez la sobrevida de estas dos concentraciones mayores a la obtenida en la concentración más elevada (30 mg/l), donde la sobrevida fue de 26,7 %. En el día final del ensayo, los porcentajes de sobrevida continuaron descendiendo, siendo de 48,9; 33,3; 13,3 y 4,4 % para las concentraciones de 5, 10, 15 y 30 mg/l de NH_4Cl , respectivamente. En los controles la sobrevida descendió hasta 35,6 % (Figura 19).

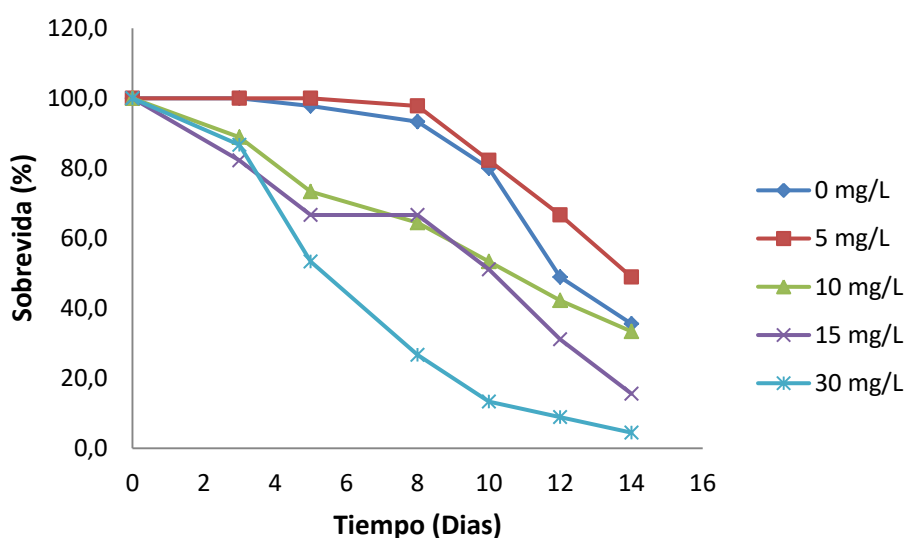


Figura 19. Porcentaje de sobrevida de *H. curvispina* en función del tiempo para las diferentes concentraciones de NH_4Cl .

No se detectó un efecto significativo de la interacción de los factores tratamiento y tiempo en la variable sobrevida ($p=0,0524$). Al analizar los factores por separado, se observó que por un lado, existe un efecto significativo del factor tratamiento sobre la variable respuesta sobrevida ($p=0,0131$). El nivel 30 mg/l con un valor de sobrevida media menor (39,26, Test de Tukey) difirió significativamente del grupo conformado por los niveles 0 y 5 mg/l, los cuales presentaron una sobrevida media mayor (76,3 y 82,21, Test de Tukey). Por

otro lado, se detectó un efecto significativo del factor tiempo en la sobrevivida ($p= 0,0001$). La sobrevivida fue mayor al inicio del ensayo (48 hs), y difirió significativamente de los días 8 y 14, con 69,78 y 27,55 (Test de Tukey), respectivamente (Ver anexo).

Luego de analizar los porcentajes de sobrevivida en tres tiempos (48 h, 8 y 14 días), se confeccionaron gráficos concentración-respuesta para NH_4Cl . De los tres gráficos obtenidos, el correspondiente a los ensayos de 8 días de exposición fue el que mejor ajustó a una curva de concentración-respuesta de tipo sigmoidea (Figura 20), obteniéndose un valor de CL50 de 14,9 mg/l de NH_4Cl .

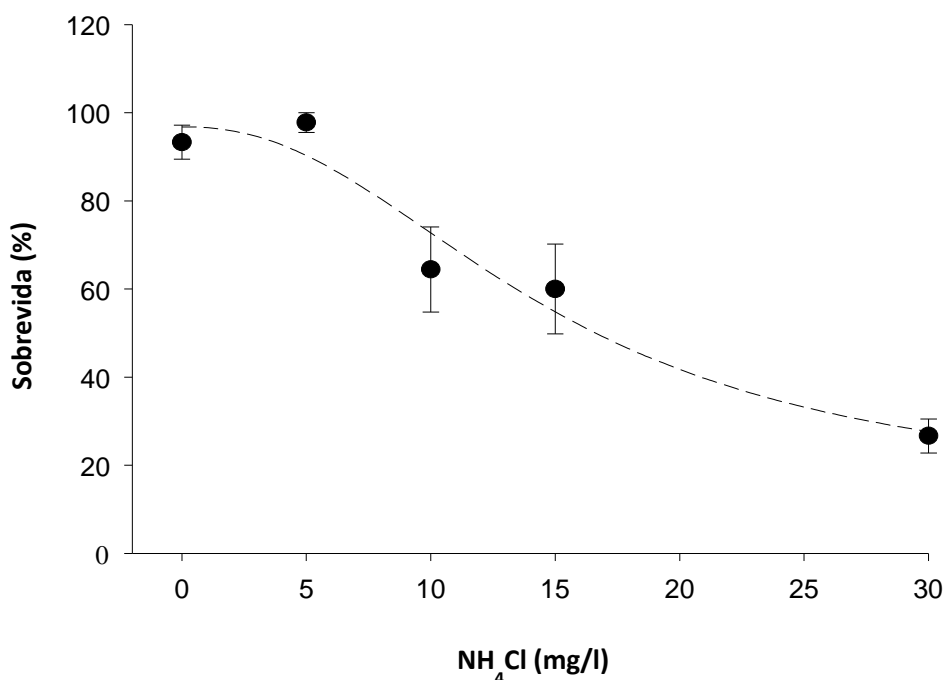


Figura 20. Curva de concentración-respuesta para *H. curvispina* a los 8 días de exposición para NH_4Cl . El valor de CL50 obtenido fue de 14,9 mg/l.

Los resultados del peso seco promedio de los organismos, al finalizar estos ensayos de amonio se muestran en la Figura 21. No se observó una tendencia marcada de muerte según el peso para ninguna de las concentraciones en los 14 días de ensayo. Además, en estos ensayos no se observó la formación de amplexos.

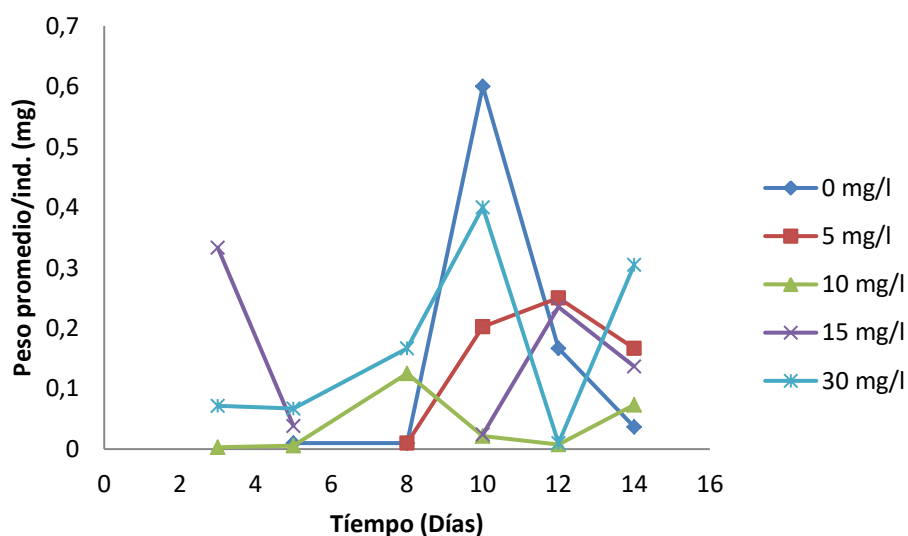


Figura 21. Peso seco promedio por individuo muerto (registrado día por medio) durante los 14 días de ensayo de exposición a diferentes concentraciones de NH_4Cl .

6.2.3 Bioensayos con agua contaminada

6.2.3.1 Parámetros físico-químicos y nutrientes del agua

Para la caracterización de la calidad del agua de los sitios seleccionados para el estudio, se determinaron diferentes parámetros físico-químicos (Tabla 3). La temperatura del agua en el día de recolección varió entre 10,5 y 14,1 °C. La conductividad fue de 102,9 $\mu\text{S}/\text{cm}$ en el sitio con menor grado de contaminación (Esquel Arriba), mientras que para el Esquel Post-PTLC, la conductividad fue de 304 $\mu\text{S}/\text{cm}$. El TDS fue de 67 mg/l para Esquel Arriba, y 203,5 mg/l para Esquel Post-PTLC. Los valores de pH fueron de 7,76 para Esquel Arriba, mientras que para Esquel Matadero y Post-PTLC fueron muy similares presentando valores de 8,54 y 8,38, respectivamente. En cuanto al oxígeno disuelto, éste presentó poca variación entre los sitios con menor y mayor grado de disturbio, siendo de 10,31 mg/l para Esquel Arriba y 10,32 mg/l para Esquel Post-PTLC. Los valores de % saturación de O_2 también presentaron poca variación, indicando valores entre 99,2 y 113,2 %.

Tabla 3. Parámetros físico-químicos de los distintos sitios de toma de agua para ensayos y del sitio de obtención de los organismos para el ensayo.

Sitio	Temperatura (°C)	Conductividad (µS/cm)	TDS (mg/l)	pH	Oxígeno (mg/l)	% saturación de O ₂
Laguna La Zeta	14,1	365	224	8,57	10,54	112,9
Esquel Arriba	11,8	102,9	67	7,76	10,31	101,6
Esquel Matadero	11,6	275	179	8,54	11,36	113,2
Esquel Post-PTLC	10,5	304	203,5	8,38	10,32	99,2

Los análisis de nutrientes para las diferentes muestras de agua del Arroyo Esquel utilizadas en los ensayos, mostraron que las concentraciones más bajas, tanto para fosfatos, como para amonio y nitratos+nitritos, fueron las del sitio Esquel Arriba, mientras que las más elevadas fueron las registradas en Esquel Post-PTLC (Tabla 4). El agua de Esquel Matadero mostró un aumento de la concentración de nitratos+nitritos en relación al sitio de referencia. En el caso del agua obtenida de la vertiente, se observaron valores más bajos de todos los nutrientes en comparación con aquellos obtenidos del agua de la Laguna La Zeta.

Tabla 4. Análisis químico de las muestras de agua utilizadas en los ensayos.

Sitio	Fosfatos (µg P-PO ₄ /l)	Amonio (µg N-NH ₄ /l)	Nitritos+Nitratos (µg N-NO ₃ /l)
Vertiente	5,2	10,07	15,93
Laguna La Zeta	21,99	35,51	19,38
Esquel Arriba	1,78	5,29	6,68
Esquel Matadero	15,3	31,01	430,88
Esquel Post-PTLC	171,17	2416,67	1312,5

6.2.3.2 Bioensayos con aguas del Arroyo Esquel

La sobrevida fue similar en los tres tratamientos hasta las 48 horas de ensayo, siendo de 93,4 % para Esquel Arriba, 89,6 % para Esquel Matadero y 88,2 % para Esquel Post-PTLC (Figura 22). En el día 8, se manifestaron las primeras diferencias entre el sitio de referencia (sobrevida de 59,3 %) y los otros dos sitios, con porcentajes de sobrevida que disminuyeron a valores de 39,3 y 45 % (Esquel Matadero y Esquel Post-PTLC, respectivamente). Hacia el final del ensayo, la sobrevida disminuyó a 14,0; 26,3 y 23,8 %, para Esquel Arriba, Matadero y Post-PTLC, respectivamente (Figura 23).

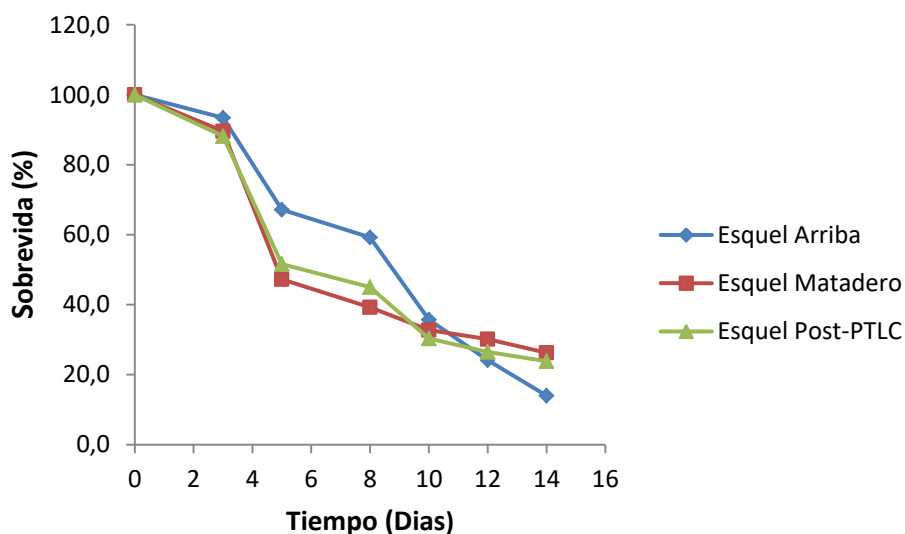


Figura 22. Porcentaje de sobrevivencia de *H. curvispina* en función del tiempo para las diferentes tipos de agua del Arroyo Esquel.

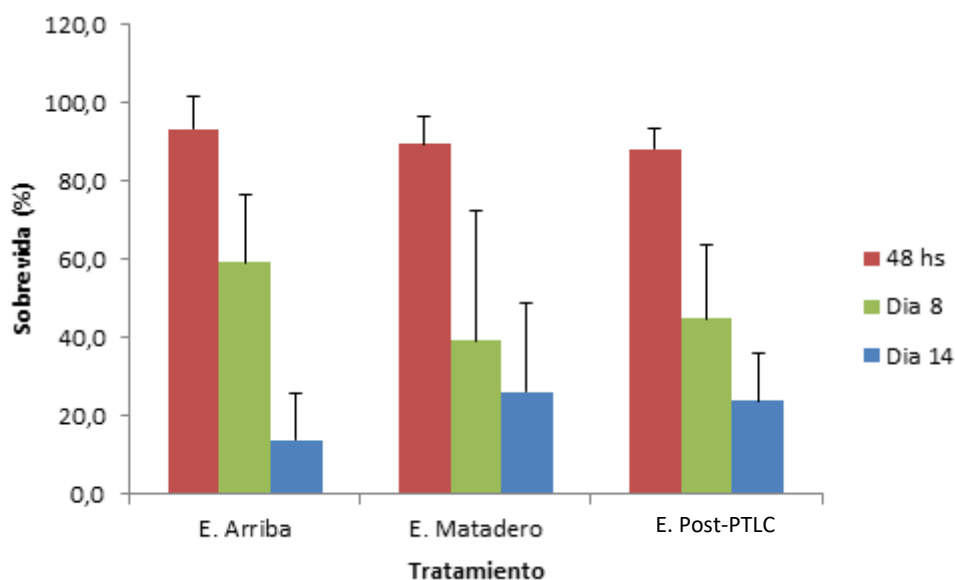


Figura 23. Porcentajes de sobrevivencia de *H. curvispina* en los días 2, 8 y 14 del ensayo.

No se detectó un efecto significativo de la interacción de los factores tratamiento y tiempo en la variable sobrevivencia ($p=0,0805$). Al analizar los factores por separado, se observó que no se detectó un efecto significativo del factor tratamiento sobre la variable respuesta sobrevivencia ($p=0,8999$), pero sí se detectó un efecto significativo del factor tiempo en la sobrevivencia ($p=0,0001$). La sobrevivencia fue mayor al inicio del ensayo (48 h), y disminuyó

significativamente de los días 8 y 14, con 47,84 y 21,37 (Test de Tukey), respectivamente (Ver anexo).

Los resultados del peso seco promedio de los organismos, al finalizar estos ensayos con aguas contaminadas se muestran en la Figura 24. No se observó una tendencia marcada de muerte según el peso para ninguna de las condiciones en los 14 días de ensayo. Además en este ensayo no se observó la formación de amplexos.

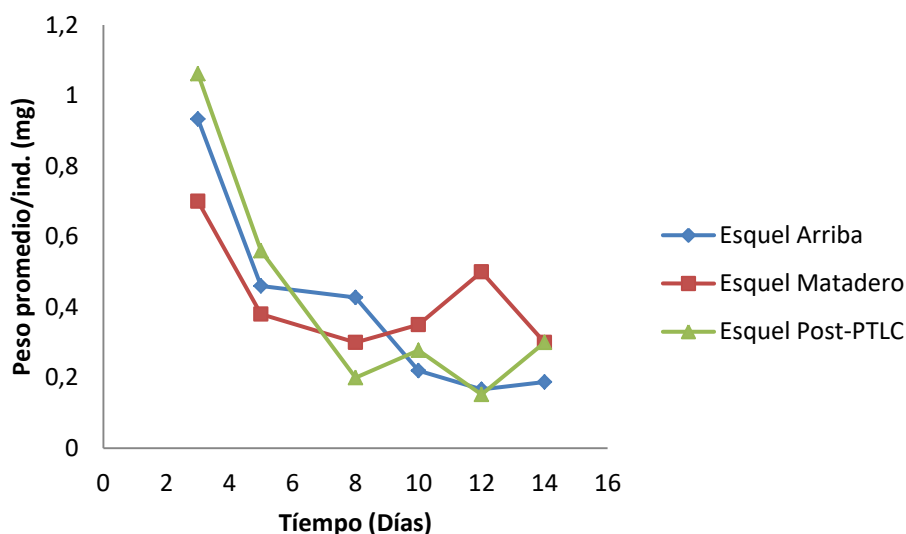


Figura 24. Peso seco promedio por individuo muerto registrado día por medio durante los 14 días de ensayo.

Durante los días en que se realizaron estos ensayos, se observó en muchos casos un rápido deterioro y descomposición de las plantas acuáticas dentro de los frascos, que posiblemente contribuyeron a una disminución de la calidad del agua, principalmente para aguas provenientes de Esquel Post-PTLC y Matadero. Debido a esto, se procedió a realizar el ensayo nuevamente, esta vez sin planta y en un tiempo más corto (7 días), para evaluar si los resultados obtenidos estaban condicionados por el estado de la planta, o realmente se debían a los efectos de los distintos tipos de agua.

6.2.3.3 Bioensayos con aguas del Arroyo Esquel en ausencia de plantas acuáticas

Al realizar el ensayo sin planta, se observó un cambio en la sobrevivencia de las hyalellas que fueron expuestas a las diferentes aguas en relación al ensayo anterior (Figura 25). Hasta las 48 horas de ensayo, la sobrevivencia fue de 78,7 % para Esquel Arriba, 82,7 % para Esquel Matadero y 17,8% para Esquel Post-PTLC. En el día 4, la sobrevivencia disminuyó a 49,3 % en Esquel Arriba. En Esquel Matadero se registraron valores intermedios, con 24,0 %, mientras que en Esquel Post-PTLC no hubo organismos sobrevivientes. Hacia el final del ensayo, en el día 7, los porcentajes continuaron disminuyendo hasta llegar al 22,7 % en el agua de Esquel arriba, y 6,7 % en Esquel Matadero (Figura 26).

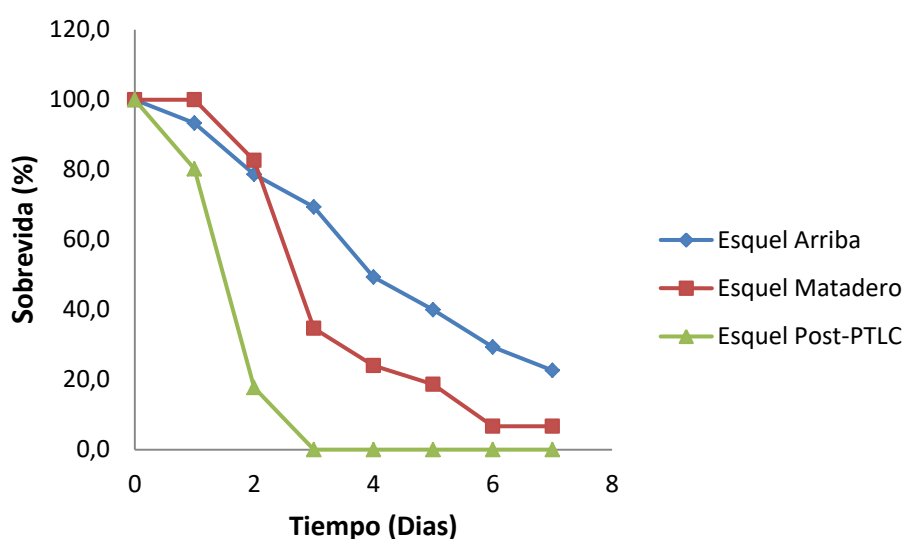


Figura 25. Sobrevivencia de *H. curvispina* en función del tiempo para las diferentes tipos de agua del Arroyo Esquel, en ausencia de la planta.

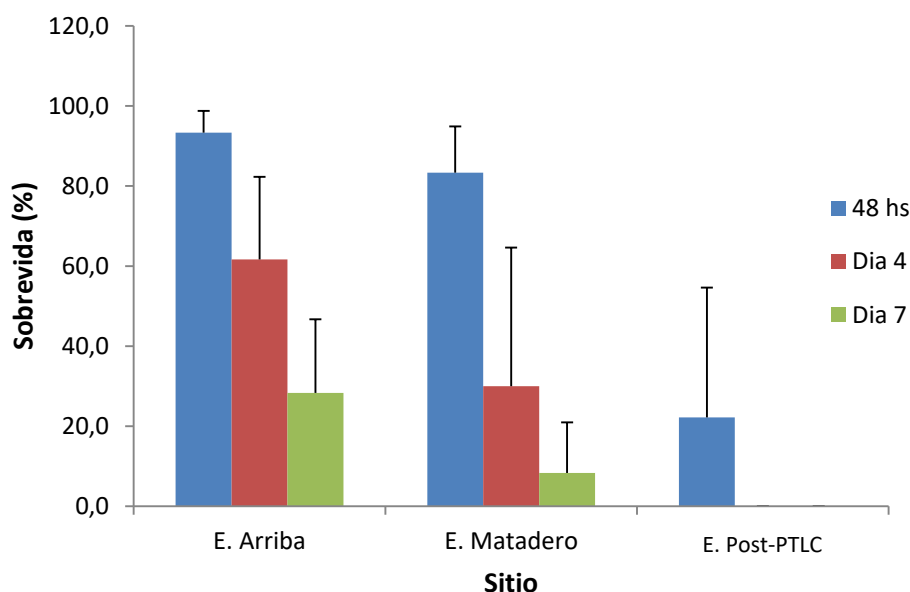


Figura 26. Porcentajes de sobrevivencia de *H. curvispina* en los días 2, 4 y 7 del ensayo.

No se detectó un efecto significativo de la interacción de los factores tratamiento y tiempo en la variable sobrevivencia ($p= 0,1266$). Al analizar los factores por separado se observó que, por una lado, existe un efecto significativo del factor tratamiento sobre la variable respuesta sobrevivencia ($p= 0,0303$). El nivel Esquel Post-PTLC con un valor de sobrevivencia media menor (26,75) difirió significativamente del nivel Esquel Arriba, el cual presentó una sobrevivencia media mayor (55,11). Por otro lado, se detectó un efecto significativo del factor tiempo en la sobrevivencia ($p= 0,0001$). Los niveles día 7 y 4 con valores de sobrevivencia media menores (9,79 y 24,44 respectivamente, Test de Tukey), difirieron significativamente de las primeras 48 h, donde la sobrevivencia media fue mayor (91,19, Test de Tukey) (Ver anexo).

Los resultados del peso seco promedio de los organismos, al finalizar estos ensayos de aguas contaminadas se muestran en la Figura 27. No se observó una tendencia marcada de muerte según el peso para ninguna de las condiciones en los 14 días de ensayo.

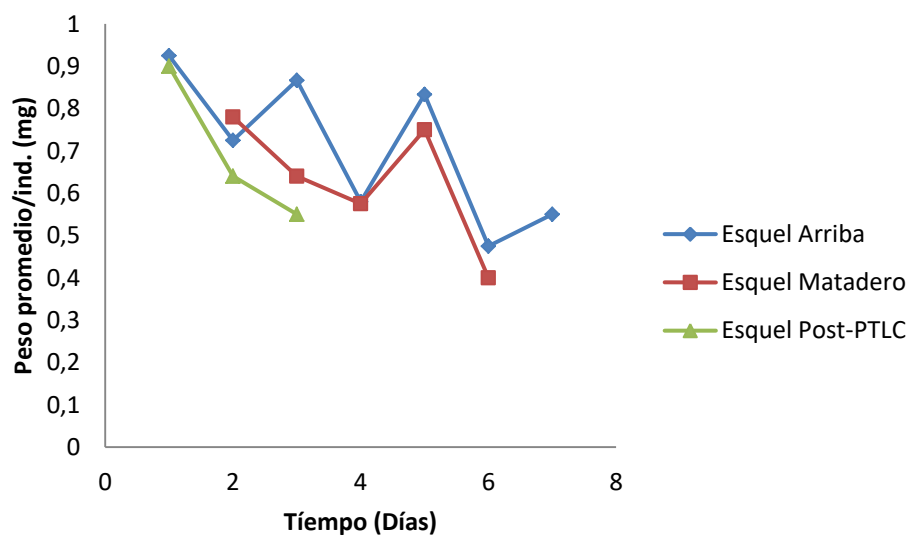


Figura 27. Peso seco promedio por individuo muerto registrado día por medio durante los 7 días de ensayo.

7. DISCUSION

La contaminación del agua es un problema creciente desde principios del siglo XIX. Las principales fuentes de contaminación son las actividades antrópicas, las cuales mediante el vertido de efluentes cloacales, cría de ganado, usos de la tierra, actividades agrícolas, permiten el ingreso al agua de diferentes sustancias de composición y estructura química muy diversa (Allan, 2004; ONU, 2017). Entre ellos, se encuentran los iones salinos y de diferentes formas reactivas del nitrógeno, los cuales representan un gran interés para este estudio. Para poder analizar algunos de los efectos de estos compuestos sobre la biota de ecosistemas acuáticos de Patagonia, se realizaron diferentes bioensayos utilizando el anfípodo de agua dulce *H. curvispina* como modelo de estudio.

Las pruebas de aclimatación de las hyalellas y la puesta a punto de los ensayos en nuestras condiciones experimentales fueron necesarias ya que no hay estudios previos disponibles con especies de la región. Se evaluó si existían diferencias en cuanto a la sobrevivencia de los organismos de acuerdo a la presencia/ausencia de plantas acuáticas y a la aireación o no del agua. En base a los resultados obtenidos a lo largo de estos ensayos, se encontró que las mejores condiciones de mantenimiento para este organismo fueron las que incluían plantas acuáticas, debido a que presentaron una mortalidad significativamente menor. La presencia de plantas no solo mejoró las condiciones de vida de las hyalellas, en cuanto a calidad del agua, oxigenación, refugio y alimento, sino que también favoreció la formación de amplexos, donde los números observados superaron en cuatro veces a aquellos obtenidos en los ensayos sin plantas.

Diferentes estudios han demostrado que las macrófitas sirven de alimento a los anfípodos. *H. curvispina* es clasificado como un organismo colector recolector y triturador facultativo, siendo el detrito su alimento principal en ambientes naturales del Río Paraná, aunque en ciertas situaciones el consumo de tejido vegetal cobra relevancia (Saigo et al., 2009). Se han realizado diversos trabajos en laboratorio analizando los efectos de diferentes dietas sobre el crecimiento y sobrevivencia de *H. curvispina*. Giusto (2014) evaluó el efecto de la dieta sobre la sobrevivencia en *H. curvispina* someténdola a tres tipos diferentes de alimentación (alimento para peces molido y algas - alimento para peces molido - algas) obteniendo valores superiores al 90 % en las dietas que contienen algas, y de 80 % en la dieta sólo a base de alimento balanceado. También observó variaciones en cuanto al peso seco y longitud de los individuos, siendo mayor para la dieta combinada.

Siguiendo con esta línea, Peluso (2011) expuso a *H. curvispina* a cinco dietas diferentes (placa con perifiton - lechuga - lechuga y alimento balanceado - placa con perifiton y alimento balanceado - placa con perifiton y lechuga) observando sobrevividas que variaron entre 60 y 90 %. Si bien el mayor porcentaje de sobrevivida se observó en los organismos alimentados con placa de perifiton, en cultivos prolongados se evidenció una acción tóxica sobre los anfípodos debido a variaciones en el contenido de algas y bacterias de dichas placas. Por este motivo, en dicho trabajo se utilizó lechuga y alimento balanceado para peces, obteniéndose un 60 % de sobrevivida. Dutra y colaboradores (2011) estudiaron el efecto de dos dietas diferentes (macrófitas – macrófitas y alimento balanceado para peces), y si bien observaron sobrevividas similares en ambas dietas, los individuos alimentados con la dieta combinada mostraron mayor actividad, número de amplexos, hembras ovígeras y huevos por hembra que los que fueron alimentados solo con macrófitas.

En el presente ensayo y al igual que Dutra y colaboradores (2011), se eligió una dieta en base a macrófitas y alimento balanceado para peces. Esta dieta fue elegida por su sencillez y bajo costo, sumado a que las macrófitas no solo actúan como alimento, sino que también proporcionan un sustrato para descansar e interactuar, además de mejorar la heterogeneidad espacial. Al comparar los valores de sobrevivida obtenidos en ambos trabajos, se observa que en nuestro ensayo los valores obtenidos variaron entre 62 y 72 % luego de 14 días, mientras que Dutra y colaboradores obtuvieron valores superiores al 95% luego de 30 días. Esta diferencia puede deberse a muchos motivos. Uno de ellos podría ser los lugares de donde provienen los organismos, ya que el trabajo realizado por Dutra y colaboradores fue en Brasil donde los anfípodos podrían tener características distintas y también a diferentes condiciones de mantenimiento (dureza del agua, temperatura, fotoperíodo, etc.) las cuales pueden modificar los resultados. Otro aspecto que podría ser diferente es la composición centesimal y el aporte calórico de las dietas, algo que no fue determinado en este estudio. Además, la experiencia del equipo de trabajo es un punto importante ya que ellos cuentan con una gran cantidad de trabajos relacionados a este tema, lo cual les ha permitido, con el tiempo, poder poner a punto muchas de las variables analizadas.

En cuanto a la aireación del agua, a pesar de que hubo diferencias significativas entre presencia/ausencia de la misma durante las pruebas de 14 días, se evidenció que la presencia de macrófitas sería el factor determinante en la sobrevivida de los anfípodos. Con estos resultados se pudo observar que frente a las condiciones experimentales planteadas no era

necesaria la aireación, lo cual facilitó la realización de los ensayos subsiguientes con un mayor número de réplicas en simultáneo.

Por otra parte, al evaluar el efecto del aireador en la concentración efectiva de amonio, se demostró una disminución de un ~27 % con respecto a la inicial, posiblemente debido a su oxidación, lo que podría afectar los ensayos restantes si se realizaran en estas condiciones. Esto sirvió como una prueba más a favor de realizar los ensayos de toxicidad sin aireación. Fuentes y colaboradores (2017) evaluaron el efecto de la aireación como alternativa de remediación para la eutrofización en una laguna de Perú, observando también una disminución en la concentración de nitrógeno con la aireación, donde el nitrógeno total presentó un descenso del 47 %, desde 5,366 mg/l hasta 2,847 en 12 horas. En este caso, la disminución del nitrógeno se debió a un proceso de nitrificación donde interviene el oxígeno que realiza una oxidación biológica del nitrógeno amoniacal generando nitratos y nitritos.

Estos ensayos de puesta a punto permitieron definir las condiciones óptimas para la realización de los siguientes ensayos de toxicidad, utilizando en cada recipiente experimental plantas acuáticas (*V. anagallis-aquatica* L.) en ausencia de aireador.

La salinidad es un factor limitante en la distribución de los organismos en los ecosistemas acuáticos. Debido a esto, los individuos tienen límites de tolerancia fuera de los cuales no pueden sobrevivir, crecer o reproducirse de manera óptima (Albarrán Melzer et al., 2017). Distintas actividades antrópicas permiten el ingreso de diferentes iones que alteran la salinidad natural de las aguas de ríos y arroyos. Estos iones producen cambios en los organismos, ya que estos necesitan mantener una presión osmótica interna en relación con el medio en el que viven.

La sobrevivencia en *H. curvispina* fue afectada por las diferentes concentraciones de cloruro de sodio, observando que la misma depende claramente del tiempo de exposición. Luego de 48 h de exposición, el porcentaje de sobrevivencia fue de ~95 % para todas las concentraciones a excepción de 10 g/l donde la misma cayó al 47,9 %. La sobrevivencia luego de 8 días de tratamiento disminuyó en forma dependiente de la concentración de NaCl permitiendo definir claramente la curva concentración-respuesta y así estimar la CL50 que fue de 0,98 g/l. Esa concentración de NaCl se corresponde con un valor de conductividad de 1628 μ S/cm, estimado a partir de una regresión lineal de los datos experimentales

presentados en la Tabla 1. Al analizar los valores de conductividad de la Laguna La Zeta, utilizada como sitio de colecta de los individuos, se observó un valor de 365 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Dentro de las concentraciones analizadas, las más bajas (0; 0,01 y 0,1 g/l) se corresponden con valores de conductividad por debajo de los de la laguna, mientras que las más altas (0,25; 0,50; 1 y 10 g/l) se encontraban por encima de los valores de la laguna y es donde se esperaría ver algún efecto en los organismos (Tabla 1). Teniendo en cuenta el valor de conductividad de su medio natural, podemos decir que el rango de tolerancia de las hyalellas es alto, ya que sobreviven en concentraciones del doble e incluso el triple de la salinidad que se encuentra en su medio natural, representadas por las concentraciones de 0,25 y 0,50 g/l respectivamente. La exposición a concentraciones superiores que se correlacionan con conductividades muy elevadas, hace que su sobrevivencia disminuya considerablemente. Sin embargo, valores de conductividad tan elevados no han sido reportados para nuestra región, aún en los sitios más disturbados (Assef et al., 2014; Manzo et al., 2020).

En el presente seminario se evaluó el efecto particular de la salinidad sobre los organismos, pero en su ambiente natural coexisten una gran variedad de sustancias (e. g. fosfatos, nitritos, nitratos, amonio, diferentes iones y contaminantes presentes en los sedimentos, etc.) que varían afectándolos en forma conjunta. Si bien se observó un porcentaje determinado de sobrevivencia y una elevada tolerancia a la salinidad, esto se debe a la exposición de los organismos frente a estas condiciones particulares de laboratorio, las cuales se basaron en los ensayos de puesta a punto, con una dieta y características determinadas. En su ambiente natural posiblemente existan efectos combinados y/o sinérgicos de diferentes sustancias que actúan ejerciendo su toxicidad mediante distintos mecanismos. Tal es el caso de los efectos negativos sobre el crecimiento y sobrevivencia observado en *Daphnia carinata* (King, 1853) frente a aumentos conjuntos de temperatura y salinidad (Hall & Burns, 2002). Algunas investigaciones han demostrado que los efectos de los estresores individuales pueden alterarse de manera compleja en presencia de otros. Beermann y colaboradores (2017) analizaron los efectos estresantes múltiples en comunidades de macroinvertebrados manipulando variables como salinidad, sedimento fino y velocidad del flujo. Cuando se combinaron estos tres factores estresantes tuvieron varios efectos (debido a las interacciones de dos o tres vías) que diferían de la suma de los efectos individuales. La disminución más fuerte en la riqueza de EPT (Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera) se produjo cuando la salinidad elevada, el agregado de sedimentos finos y baja velocidad de flujo estaban actuando

juntos, y esta disminución fue más severa de lo esperado en función de los efectos estresantes individuales o por pares involucrados. Resultados similares fueron obtenidos por Elbrecht y colaboradores (2016), al analizar los efectos de nutrientes, sedimento fino y velocidad de flujo en una comunidad de macroinvertebrados. De acuerdo a Kefford y colaboradores (2004), las determinaciones experimentales no tienen en cuenta otros cambios en el entorno natural, ya que generalmente se realizan frente a temperaturas constantes y sin otros factores estresantes, como puede ser la presencia de otras especies, como los predadores, lo que genera un costo energético mayor al aumentar, por ejemplo, la actividad física.

Cuando la concentración de sal del medio es demasiado alta, los mecanismos osmorreguladores colapsan provocando estrés, daño celular y posiblemente la muerte (Cañedo-Argüelles et al., 2013). Todos los organismos acuáticos responden de la misma manera a la salinización mediante la evitación. Algunos permanecen en diapausa donde sus huevos o quistes toleran salinidades más altas, otros con cierta movilidad se mueven a mayores profundidades donde pueden sobrevivir y aquellos que son más móviles migran hacia áreas de menor conductividad (Dunlop et al., 2005; James et al., 2003; Karraker, 2007). Particularmente en organismos de agua dulce, las condiciones óptimas de sal para los crustáceos varían desde un nivel de alrededor de cero hasta aproximadamente el 2 ‰. Distintas comparaciones de organismos indican la existencia de crustáceos tolerantes a la salinidad (e.g. Cladocera y Palaemonidae) y otros muy tolerantes a la salinidad (e.g. Copépoda, Ostrácoda y Parasticidae). Las concentraciones de sal más elevadas o más bajas que las óptimas, pero aún dentro del rango de tolerancia, cumplen un papel como factores de estrés capaces de causar cambios en la fisiología, comportamiento, historia de vida y morfología (Grzesiuk & Mikulski, 2006). De manera similar, Kefford y Nugegoda (2005) evaluaron el crecimiento y la reproducción del caracol dulceacuícola *Physa acuta* (Draparnaud, 1805) en diferentes niveles de salinidad. Frente a la suposición de que no hay un efecto directo de la salinidad en los animales de agua dulce hasta un umbral, más allá del cual se producirán efectos subletales como la reducción del crecimiento y la reproducción, observaron que tanto el crecimiento como el número de huevos producidos por caracol por día fue máximo a concentraciones intermedias. En el mencionado trabajo se demuestra que en lugar de una respuesta umbral a la salinidad, pequeños aumentos en la salinidad (desde niveles bajos), pueden producir un mayor crecimiento y reproducción hasta alcanzar un máximo. Más allá de ese punto, los aumentos adicionales de salinidad resultan en una

disminución en el crecimiento y la reproducción. En aguas de baja salinidad la deficiencia de iones puede producir efectos subletales en animales de agua dulce, como el aumento en el costo energético de la formación de conchas en algunos moluscos (Palmer, 1992). Muchos animales de agua dulce mantienen concentraciones internas de los principales iones a niveles más elevados que en el agua circundante, gastando más energía metabólica. Se asume que ese gasto de energía sería mucho menor a niveles de salinidad cercanos al punto isosmótico. En este punto, debería haber más energía disponible para otros usos, entre ellos crecimiento y reproducción. Esto explicaría el mayor crecimiento de *P. acuta* (Draparnaud, 1805) en concentraciones intermedias. Probablemente lo mismo ocurre con *H. curvispina*, ya que en este estudio se obtuvieron resultados similares, donde el mayor porcentaje de sobrevivida se observó en la concentración intermedia de 0,50 g/l tanto en el día 2, 8 y 14, superando incluso al porcentaje observado en el control (0 g/l) (Figura 16).

Si bien los altos niveles de salinidad representan una amenaza mucho mayor para los organismos de agua dulce, la información disponible sobre sus efectos en crustáceos de estos ambientes es menor en relación a la información disponible para organismos marinos o estuarinos. Los diferentes mecanismos y respuestas adaptativas a la salinidad de los organismos de agua dulce requieren de mayor análisis (Grzesiuk & Mikulski, 2006).

En los ecosistemas acuáticos podemos encontrar distintas formas de nitrógeno como resultado de deposiciones, diluciones, descomposiciones y fijaciones naturales, sin embargo hay muchas actividades antrópicas que mediante diferentes fuentes de contaminación alteran el ciclo del nitrógeno aumentando su disponibilidad, siendo una de las formas más abundantes el ion amonio (NH_4^+) (Camargo & Alonso, 2007). Diferentes fuentes de nitrógeno ingresan al sistema hídrico mediante el uso de fertilizantes, residuos domésticos, aguas residuales humanas, efluentes industriales y excretas animales (Fernández, 2005). En nuestra región (noroeste del Chubut), las principales actividades antropogénicas que promueven la entrada de nutrientes en el agua son el vertido de efluentes cloacales y la cría de ganado junto con prácticas inadecuadas resultantes de la ganadería (Horak et al., 2019; Manzo et al., 2020; Miserendino et al., 2016).

En los ensayos realizados, las concentraciones de cloruro de amonio mayores a 5 mg/l afectaron la sobrevivida en *H. curvispina*, en relación a los grupos control. Todas las concentraciones de NH_4Cl testeadas fueron superiores a las presentes en el ambiente natural

de donde se obtuvieron los organismos, en donde se encontró 0,035 mg/l de amonio, es decir, una concentración muy baja y cercana a la del control. Al analizar los porcentajes de sobrevivencia para cada una de las concentraciones, puede observarse que los mismos dependen claramente del tiempo de exposición. A las 48 h de exposición, el porcentaje de sobrevivencia fue superior al 82 % para todas las concentraciones. Sin embargo, la sobrevivencia a los 8 días de tratamiento disminuyó en forma dependiente de la concentración de NH_4Cl , permitiendo realizar el ajuste a una curva tipo concentración-respuesta y estimar la CL_{50} que fue de 14,9 mg/l. Si bien estos valores de amonio son muy elevados, se han reportado mediciones en ese rango, en sitios del Arroyo Esquel ubicados aguas abajo de la PTLC (Assef et al., 2014; Manzo et al., 2020).

Borgmann (1994), reportó tanto en juveniles como en adultos de *H. azteca* una CL_{50} de 11 mg/l de amoníaco luego de 10 semanas de exposición, donde el crecimiento no fue afectado a concentraciones por debajo de la que causó la mortalidad crónica. Además, reportó una CL_{50} luego de 96 h, de 26 mg/l de amoníaco. Por su parte, Peluso (2011), sometió a juveniles de *H. curvispina* a concentraciones entre 3,8 y 6 mg/l de amonio, en las cuales no observó cambios en la sobrevivencia ni en la longitud de los organismos. Al comparar estos datos con los resultados obtenidos en este estudio, frente a concentraciones comparables a las utilizadas por Peluso (2011), se observó un comportamiento similar. La sobrevivencia de *H. curvispina* dentro de un rango de concentración similar (0 a 5 mg/l) no difiere prácticamente en relación al grupo control. Si bien la sobrevivencia luego de 8 días decae para esas concentraciones, lo hace en forma similar al control (Figura 19 y 20).

Es interesante mencionar que aún para una misma especie, se han reportado diferencias en cuanto a la respuesta a la exposición a compuestos nitrogenados. En este sentido, en España central, Alonso y Camargo (2003) evaluaron la toxicidad a corto plazo de amoníaco, nitrito y nitrato en el caracol acuático *Potamopyrgus antipodarum* (Gray, 1853), encontrando un nivel de toxicidad $\text{NH}_3 > \text{NO}_2 > \text{NO}_3$ y reportando un valor de CL_{50} a 96 h de 2,02 mg/l de $\text{NH}_3\text{-N}$. Hickey y Vickers (1994), al probar la toxicidad del amoníaco en una población nativa de Nueva Zelanda de *P. antipodarum* (Gray, 1853), estimaron un valor de CL_{50} a 96 h de 0,31 mg/l de $\text{NH}_3\text{-N}$, un valor mucho más bajo que el obtenido por Alonso y Camargo (2003), quienes explican como posibles causas de estas diferencias el tamaño medio de los caracoles (2,5 mm contra 3,6 mm) y el origen distinto de las poblaciones. Su tolerancia

a los compuestos del nitrógeno en general explica su éxito ecológico como especie invasora en muchos ecosistemas acuáticos contaminados del mundo.

Se analizó también la posible contribución de la sal de NH_4Cl al aumento de la salinidad total y por ende a la conductividad del medio (Tabla 2). Al analizar estos valores, se observó que la concentración más elevada de NH_4Cl (30 mg/l), presentó una conductividad promedio de 257,7 $\mu\text{S/cm}$, mientras que la CL_{50} de NH_4Cl se corresponde con un valor de conductividad de 164 $\mu\text{S/cm}$. Al compararlo con el ensayo de salinidad, estos valores son equivalentes a los obtenidos para las concentraciones más bajas de NaCl , donde no se observaron efectos sobre la sobrevivencia de las hyalellas. De todos modos, no se descarta la posibilidad de un efecto sinérgico entre ambos parámetros, donde a una determinada conductividad y concentración de amonio se puedan presentar mayores efectos que los que se obtendrían en forma aislada (Beermann et al., 2017; Elbrecht et al., 2016; Halls & Burns, 2002).

Los ensayos de exposición permitieron evidenciar efectos negativos sobre la sobrevivencia de *H. curvispina* en relación a incrementos de la salinidad y del amonio. Es importante destacar que el nivel de sensibilidad a diferentes compuestos tóxicos puede verse alterado en función de la calidad ambiental de donde provengan los organismos. En este caso, los ensayos se realizaron con organismos provenientes de sitios poco disturbados lo que garantiza una mayor sensibilidad en la respuesta (Del Brio et al., 2018).

Es importante destacar que en los ensayos tanto de salinidad como amonio no se observó la formación de amplexos, lo que podría deberse a diferentes razones. Una de ellas podría ser la disminución de la escala experimental en relación a la utilizada en el ensayo de puesta a punto, ya que se redujo el tamaño del frasco y por lo tanto el volumen de agua y el número de individuos utilizados. Al disminuir el número de individuos por frasco, y no diferenciar en machos y hembras, la probabilidad de distribución equitativa entre los mismos podría influir negativamente en la formación de amplexos. La ausencia de amplexos podría deberse también a la variación en las temperaturas registradas durante los distintos ensayos. En el ensayo de aclimatación y puesta a punto, se observó que la temperatura se encontraba ~2-3 °C por encima de la que se registró para los ensayos de salinidad y amonio. En relación a esto, otro punto a tener en cuenta es que para poder llegar al momento de la reproducción, se deben dar una serie de condiciones fisiológicas y ambientales. Durante la realización del

ensayo de puesta a punto, el agua de la laguna presentaba una determinada temperatura, lo que quizás favoreció que los organismos cuenten con las condiciones necesarias para poder reproducirse una vez que estuvieran en el laboratorio, diferenciándose de los que fueron recolectados posteriormente para los ensayos de salinidad y amonio. Para estos últimos, la temperatura del agua de la laguna al momento de recolección fue inferior, haciendo que tal vez los organismos no alcancen las mismas condiciones y madurez que los primeros, quienes lograron formar amplexos.

Por otro lado, las respuestas observadas del peso seco (variable asociada con la talla de los organismos), fueron muy variables, y no se obtuvieron resultados concluyentes. El peso seco permite ver la sensibilidad al tóxico en función de la talla de los organismos, lo que se puede relacionar con su edad/sexo. Generalmente, para determinar la talla se miden parámetros como algunas partes esclerotizadas o algunos segmentos del tórax, es decir, secciones del cuerpo que no varíen con la cantidad de alimento que consume el organismo, como sí pueden hacerlo en relación al peso seco. Si bien el método utilizado no es el más apropiado para medir la talla, se puede utilizar en situaciones en donde no se tengan referencias o no se pueda medir a los organismos en forma individual, como ocurrió en el presente estudio.

Con el aumento de la población humana en los últimos tiempos, los ecosistemas de agua dulce sufren presiones constantes como consecuencia de distintas acciones antropogénicas, donde una de las principales fuentes de contaminación son las aguas residuales no tratadas (Miserendino et al., 2008; Mor et al., 2019). En nuestra zona y particularmente en el Arroyo Esquel, la contaminación antrópica es muy fuerte, existiendo sectores con altos niveles de formas oxidadas de nitrógeno debido a descargas sin tratamiento sobre el arroyo, y otros sectores donde se detectan concentraciones elevadas de fosfatos, nitritos, nitratos y amonio como consecuencia de la gran actividad ganadera presente en los campos circundantes y del vertido de efluentes cloacales de la PTLC de la ciudad de Esquel. Esta planta es poco eficiente en restaurar la integridad del agua antes de descargarla en el Arroyo Esquel, lo que resulta en una eutrofización que amenaza la biodiversidad acuática (Manzo et al., 2020). Un aspecto negativo de su funcionamiento es la descarga de los efluentes con altos contenidos de amonio en las corrientes del arroyo, ya que el amonio tiene efectos generalizados sobre la biota al producir toxicidad (Horak et al., 2019; Manzo et al.,

2020). Las corrientes dulceacuícolas de la Patagonia son sistemas pobres en nutrientes con una biota muy endémica (Miserendino et al., 2011). Cuando los niveles de nutrientes aumentan, los ambientes reaccionan de manera muy drástica pudiendo observarse impactos negativos en su biodiversidad (Manzo et al., 2020).

Los diferentes grados de contaminación presentes en el Arroyo Esquel, disminuyeron la sobrevida de *H. curvispina*. Al analizar los diferentes parámetros de calidad de agua y nutrientes de los sitios del Arroyo Esquel escogidos para la realización del presente estudio, se pudo observar un efecto diferencial sobre la sobrevida en relación al origen del agua para los ensayos. Estos resultados se evidenciaron particularmente en el ensayo modificado sin la incorporación de macrófitas, ya que en su presencia se observó un deterioro de la planta que afectó notoriamente la calidad del agua y por ende la sobrevida de las hyalellas.

Si bien los niveles de conductividad eléctrica del agua de los tres sitios del Arroyo Esquel (Tabla 3) fueron más bajos que los niveles encontrados en la Laguna La Zeta, no ocurrió lo mismo con los nutrientes (Tabla 4). El agua del sitio de referencia (Esquel Arriba), presentó concentraciones de fosfatos, amonio y nitratos+nitritos que se encontraron muy por debajo de las obtenidas en la Laguna La Zeta, y coincide con el tratamiento que presentó mayor porcentaje de sobrevida. En el sitio de contaminación intermedia (Esquel Matadero), los niveles de fosfatos y amonio en agua fueron muy similares a los de la laguna, no así los de nitratos+nitritos, los cuales fueron muy elevados en comparación con la misma. Estos altos niveles de formas oxidadas de nitrógeno sugieren un aporte de nitrógeno amoniacal aguas arriba del sitio de muestreo, posiblemente debido a descargas cloacales sin tratamiento. Los resultados obtenidos muestran una disminución de la sobrevida de *H. curvispina* en presencia de agua obtenida de Esquel Matadero (34,7 %) en relación al sitio Esquel Arriba (69,3 %), a 4 días de tratamiento (ensayo sin planta). En el sitio Esquel Post-PTLC, los niveles de los tres nutrientes superaron ampliamente los valores encontrados en su sitio natural, debido mayormente a los vertidos de efluentes de la PTLC, y a la actividad ganadera de los campos circundantes (Assef et al., 2014; Manzo et al., 2020). La sobrevida de *H. curvispina* obtenida en presencia de estas aguas fue significativamente menor a las otras dos.

En el ensayo de aguas contaminadas, y a diferencia de los dos anteriores donde solo se evaluó el efecto de la salinidad o el amonio en forma individual, al exponer a los organismos a aguas con tres niveles diferentes de contaminación, se evaluó el efecto de todas las

sustancias que pudieran estar presentes en el arroyo en mayor o menor medida y que podrían actuar de forma conjunta sobre los organismos acuáticos. Diferentes estudios realizados sobre el Arroyo Esquel demuestran el deterioro de la calidad del agua en los sitios posteriores a la urbanización y en particular luego de la PTLC. Miserendino (1995) analizó la composición y distribución del macrozoobentos del Arroyo Esquel, describiendo tres grandes grupos: el primero, asociado a la cabecera del arroyo, con aguas bien oxigenadas, periodos de congelamiento y alturas mayores, el segundo constituido por los puntos del tramo medio del arroyo, con carga orgánica baja y niveles de oxígeno normales, encontrando como especies constantes algunas especies de dípteros, plecópteros, tricópteros, coleópteros, efemerópteros y anélidos. Por último, un tercer grupo afectado por las descargas orgánicas en donde predominaban las especies consideradas como indicadoras de contaminación o tolerantes al enriquecimiento orgánico fuerte.

García Sotillo (2011) analizó los efectos de la cloración de efluentes cloacales tratados sobre la calidad del agua del Arroyo Esquel describiendo distintas zonas en el arroyo: 1) una zona de aguas limpias aguas arriba de la descarga de la PTLC; 2) una zona de degradación ubicada 310 metros aguas abajo de la descarga, caracterizada por una saturación de oxígeno del 40 % y aguas de color grisáceo; 3) una zona de descomposición activa (a 1,65 km del punto anterior) donde se registró el menor porcentaje de saturación de oxígeno (<26 %), malos olores en el agua, color ceniza oscuro, depósitos de lodo en fondo, grandes poblaciones de gusanos oligoquetos *Tubifex* sp. y larvas de invertebrados tolerantes a la escasa concentración de oxígeno; 4) una zona de recuperación (a 3,49 km del punto anterior), con aguas más transparentes que la zona anterior, con proliferación de algas, una recuperación rápida del oxígeno y la aparición de microcrustáceos; 5) zona de aguas limpias posterior al vertido (desembocadura del arroyo Esquel en el río Percy a 8,96 km del punto anterior), comienza donde el río recupera las condiciones anteriores al vertido cloacal, y se extiende aguas abajo.

Por otro lado, a nivel de la comunidad de macroinvertebrados bentónicos la desaparición de grupos faunísticos indicadores del buen estado de los ecosistemas lóticos y la aparición de grupos oportunistas evidenciaron ya desde hace 20 años el deterioro creciente del tramo medio del Arroyo Esquel donde el vertido de efluentes cloacales fue el factor más importante (Miserendino, 1995; Miserendino et al., 2008). Los bioensayos con aguas del Arroyo Esquel realizados en este trabajo, sugieren que la sensibilidad de *H. curvispina* a los

distintos grados de contaminación son un reflejo de la respuesta de la comunidad de macroinvertebrados a los disturbios descritos en los trabajos antes mencionados.

8. CONCLUSIONES

En este estudio se evidenciaron los efectos nocivos de la salinidad sobre *H. curvispina* en términos de incrementos de cloruro de sodio y del cloruro de amonio, aceptando la hipótesis propuesta. Incrementos de estos iones se asocian generalmente a cambios en la calidad del agua como consecuencia de las distintas actividades antrópicas entre las que se destacan en nuestra región, el vertido de efluentes cloacales de la PTLC, las descargas domiciliarias sin tratar en los tramos urbanos del arroyo y las actividades ganaderas. El ensayo con aguas contaminadas permitió aceptar la hipótesis que plantea que las aguas provenientes de sitios con alto contenido de amonio y salinidad tienen efectos tóxicos sobre *H. curvispina*, en relación a aguas menos contaminadas. Los datos presentados reflejan los observados en los estudios ecológicos, donde los mayores efectos tóxicos se observaron para aguas provenientes de sitios con marcado deterioro de la calidad del agua y la biodiversidad.

Los resultados obtenidos permiten aceptar la hipótesis general de trabajo que propone que el anfípodo nativo *H. curvispina* es apto para su utilización en bioensayos para la evaluación de efectos tóxicos de contaminantes acuáticos. Si bien quedan por delante ensayos de cría en laboratorio que permitan mantener los individuos en mejores condiciones durante periodos más prolongados, este trabajo aporta datos sobre métodos de obtención en campo y mantenimiento para llevar a cabo distintos ensayos experimentales en el futuro, con especies nativas. Muestra la potencialidad de la especie para evaluar el efecto de diferentes tóxicos que resulten de interés para la región.

En conclusión, este estudio destaca la potencialidad del uso de *H. curvispina*, nativa de la región, como organismo de prueba en ensayos de toxicidad. Esta especie demostró sensibilidad a incrementos de salinidad y amonio, y una respuesta gradual en presencia de aguas con distinto grado de contaminación.

9. BIBLIOGRAFIA

Albarrán Méizer, N. C.; L. J. Rangel Ruiz; L. M. Gama Campillo; J. A. Arévalo de la Cruz; E. Moguel-Ordóñez & C. J. Pacheco Figueroa. 2017. Tolerancia a la salinidad aguda de gasterópodos dulceacuícolas nativos e introducidos en Tabasco, México. *Hidrobiológica*. 27: 145-151.

Alcalá-Carrillo, M.; S. G. Castillo-Vargasmachuca & J. T. Ponce-Palafox. 2016. Efectos de la temperatura y salinidad sobre el crecimiento y supervivencia de juveniles de pargo *Lutjanus guttatus*. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 44: 159-164.

Allan, J. D. 2004. Landscapes and riverscapes: The influence of land use on stream ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 35: 257-284.

Allan, J. D. & M. M. Castillo. 2007. *Stream Ecology. Structure and Function of Running Waters*. 2º Ed. Springer. 444 pp. E-book: ISBN 978-1-4020-5583-6.

Alonso, A. & J. A. Camargo. 2003. Short-Term toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to the aquatic snail *Potamopyrgus antipodarum* (Hydrobiidae, Mollusca). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 70: 1006-1012.

Álvarez, Z. & J. Ewald. 1990. Efectos de la salinidad y la dieta sobre el desarrollo larvario de *Sesarma ricordi*. *Scientia Marina*. 54: 55-60.

American Public Health Association (APHA). 1994. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19th Ed. APHA, Washington US.

Anguiano, O.; C. Castro; A. Venturino & A. Ferrari. 2014. Acute toxicity and biochemical effects of azinphos methyl in the amphipod *Hyaella curvispina*. *Environmental Toxicology*. 29. 10.1002/tox.21834.

Anguiano, O. L.; M. Vacca; M. E. Rodríguez Araujo; M. Montagna; A. Venturino & A. Ferrari. 2017. Acute toxicity and enterase response to carbaryl exposure in two different populations of amphipods *Hyaella curvispina*. *Aquatic Toxicology*. 188: 72-79.

Araqué, A. K. 2015. Análisis del plan de manejo de la Reserva Natural Urbana Laguna La Zeta (Esquel – Pcia. del Chubut) bajo la visión de la gestión integrada de los recursos hídricos. Tesis de maestría en Gestión integrada de los recursos hídricos. Universidad Nacional del Litoral.

Assef, Y. A.; M. L. Miserendino & C. N. Horak. 2014. The multixenobiotic resistance mechanism in species of invertebrates associated to an urban stream in the Patagonia mountain. *Water Air and Soil Pollution*. 225: 1-13.

Assef, Y. A.; C. Y. Di Prinzio & C. N. Horak. 2019. Differential activities of the multixenobiotic resistance mechanism in freshwater fishes inhabiting environments of Patagonia Argentina. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C* 207: 32–40.

Au, S. Y.; T. F. Bruce; W. C. Bridges & S. J. Klaine. 2015. Responses of *Hyalella azteca* to acute and chronic microplastic exposures. *Environmental toxicology and chemistry* 34: 2564-2572.

Barbour, M. T.; J. Gerritsen; B. D. Snyder & J. B. Stribling. 1999. Rapid bioassessment protocols for use in streams and wadeable rivers: periphyton, benthic macroinvertebrates and fish. U.S. Environmental Protection Agency; Office of Water. Washington, D.C. 339 pp.

Barceló, D. & M. J. López. 2008. Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Jornadas de presentación de resultados: el estado ecológico de las masas de agua. Panel científico-técnico de seguimiento de la política de aguas, Sevilla.

Beermann A. J.; V. Elbrecht; S. Karnatz; L. Ma; C. D. Matthaei; J. J. Piggott & F. Leese. 2017. Multiple-stressor effects on stream macroinvertebrate communities: A mesocosm experiment manipulating salinity, fine sediment and flow velocity. *Science of the Total Environment*. 610-611: 961-971.

Berenzen, N.; R. Schulz & M. Liess. 2001. Effects of chronic ammonium and nitrite contamination on the macroinvertebrate community in running water microcosms. *Water Research*. 35: 3478-3482.

Blaise, C. 2000. Canadian application of microbiotest to assess the toxic potential of complex liquid and solid media. New microbiotest for routine toxicity screening and biomonitoring. Kluwer Academic. Plenum publishers. New York. Contribution. 1: 3-11.

Bonada, N.; N. Prat; V. H. Resh & B. Statzner. 2006. Developments in aquatic insect biomonitoring: a comparative analysis of recent approaches. Annual Review of Entomology. 51: 495-523.

Borgmann, U. 1994. Chronic toxicity of ammonia to the amphipod *Hyalella azteca*; importance of ammonium ion and water hardness. Environmental Pollution. 86: 329–335.

Borgmann, U.; D. T. Bennie; A. L. Ball & V. Palabrica. 2007. Effect of a mixture of seven pharmaceuticals on *Hyalella azteca* over multiples generations. Chemosphere. 66: 1278-1283.

Brand, C.; Y. A. Assef & M. L. Miserendino. 2018. Expansión del caracol invasor *Physa acuta* (Gastropoda: Physidae) en una cuenca urbanizada de la Patagonia. En: VIII Congreso Argentino de Limnología. Luján, Buenos Aires.

Burton, P. A. & P. F. Landrum. 2003. Toxicity of sediments. En: Enciclopedia of Sediments and Sedimentary Rocks. Middleston, G. V.; M. J. Church; M. Corigilo; L. A. Hardie; & F. J. Longstaffe. Kuwer Academic Publishers, Dordrecht. 748- 751.

Camargo, J. A. & A. Alonso. 2007. Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. Ecosistemas. 16: 98-110.

Cañedo-Argüelles, M.; B. J. Kefford; C. Piscart; N. Prat; R. B. Schäfer & C. J. Schulz. 2013. Salinisation of rivers: an urgent ecological issue. Environmental Pollution. 173: 157-167.

Colla, M. F. 2015. Estudio de poblaciones de *Hyalella* Smith 1874, (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae), en ambientes acuáticos de la reserva de Usos Múltiples Isla Martín García, Provincia de Buenos Aires. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata. 110 pp.

De Cooman, W.; C. Blaise; C. Janssen; L. Detemmerman; R. Elst & G. Persoone. 2015. History and sensitivity comparison of two standard whole-sediment toxicity tests with crustaceans: the amphipod *Hyaella azteca* and the ostracod *Heterocypris incongruens* microbiotest. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems. DOI: 10.1051/kmae/2015011.

De March, B. G. E. 1978. The effects of constant and variable temperatures on the size, growth and reproduction of the freshwater amphipod *Hyaella azteca* (Saussure). Canadian Journal of Zoology. 56: 1801-1806.

Del Brio, J.; C. M. Montagna; B. A. Lares; M. E. Parolo & A. Venturino. 2018. Chemical characterization and toxicity of water-accommodated fraction of oil on the South American native species *Hyaella curvispina*. Environmental Toxicology and Pharmacology. 60: 209-215.

Díaz Báez, M. C.; G. D. Bulus Rossini & Y. Pica Granados. 2004. Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad. En: G. Castillo Morales ed. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. México. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. 99-124 pp.

Díaz, F. M. 1985. Contaminación de las aguas subterráneas por nitratos – Situación existente en el aglomerado bonaerense, Anales del XII Congreso Nacional del Agua, Tomo III (a), CONAGUA 85, Mendoza, República Argentina, 1985, 21.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

Dunlop, J., G. McGregor & N. Horrigan. 2005. Potential Impacts of Salinity and Turbidity in Riverine Ecosystems, National Action Plan for Salinity and Water Quality, ISBN 1741720788. WQ06 Technical Report. QNRM05523.

Dutra, B. K.; R. B. Santos; A. A. P. Bueno & G. T. Oliveira. 2011. Effect of different diets on the biochemical composition, lipid peroxidation and reproductive traits of *Hyaella pleoacuta* and *Hyaella curvispina*. Animal Biology. 61: 349-368.

Elbrecht, V.; A. J. Beermann; G. Goessler; J. Neumann; R. Tollrian; R. Wagner; A. Wlecklik; J. J. Piggott; C. D. Matthaei & F. Leese. 2016. Multiple-stressor effects on stream invertebrates: a mesocosm experiment manipulating nutrients, fine sediment and flow velocity. *Freshwater Biology*. 61: 362-375.

Elosegui, A. & S. Sabater. 2009. Conceptos y técnicas en ecología fluvial. Fundación BBVA. España. 462 pp.

Fernández, N. R. 2005. Estudio de la concentración de nitratos, nitritos y amonio en el agua de consumo del partido de Moreno – Provincia de Buenos Aires. Trabajo de investigación de grado. Universidad de Flores.

Fernández, R. L. 2012. Los macroinvertebrados acuáticos como indicadores del estado ecológico de los ríos. *Páginas de información ambiental*. 39: 24-29.

Fuentes, W. S.; Y. Bendezú; R. Rosado; R. Amner; M. Quispe & J. A. Reyes. 2017. Efecto de la aireación como alternativa de remediación para la eutrofización de la Laguna de Paca. *Prospectiva Universitaria*. e - ISSN 1990 – 7044.

Gamboa, M.; R. Reyes & J. Arrivillaga. 2008. Macroinvertebrados bentónicos como bioindicadores de salud ambiental. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. 48: 109-120.

García Sotillo, M. F. 2011. Efectos de la cloración del efluentes cloacales tratados sobre la calidad del agua de ambientes lóticos naturales. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. 63 pp.

García, M. E. 2009. Estudio del efecto de la contaminación sobre invertebrados del complejo zoobentónico en arroyos de la llanura pampeana. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata. 322 pp.

García, M. E.; A. Rodríguez Capitulo & L. Ferrari. 2010. Age-related differential sensitivity to cadmium in *Hyalella curvispina* (Amphipoda) and implications in ecotoxicology studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 73: 771-778.

Giusto, A. 2014. Efectos de la contaminación por metales pesados sobre anfípodos de agua dulce y su aplicación en estudios de toxicidad de sedimentos. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. 283 pp.

Giusto, A.; A. Salibián & L. Ferrari. 2014. Biomonitoring toxicity of natural sediments using juvenile *Hyalella curvispina* (Amphipod) as test species: evaluation of early effect endpoints. *Ecotoxicology*. 23: 293-303.

Grzesiuk, M. & A. Mikulski. 2006. The effect of salinity on freshwater crustaceans. *Polish Journal of Ecology*. 54: 669-674.

Guerra Jara, D. A. 2017. Alteración física y fisiológica en un macroinvertebrado acuático (Género *Smicridea*) como efectos de cambio en la salinidad. Tesis de Ingeniería Ambiental. Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias. 88 pp.

Hall, C. J. & C. W. Burns. 2002. Mortality and growth responses of *Daphnia carinata* to increases in temperature and salinity. *Freshwater Biology*. 47: 451-458.

Hickey, C. W. & M. L. Vickers. 1994. Toxicity of ammonia to nine native New Zealand freshwater invertebrate species. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 26: 292-298.

Horak, C. N.; Y. A. Assef & M. L. Miserendino. 2019. Assessing effects of confined animal production systems on water quality, ecological integrity, and macroinvertebrates at small piedmont streams (Patagonia, Argentina). *Agricultural Water Management*. 216: 242-253.

James, K. R.; B. Cant & T. Ryan. 2003. Responses of freshwater biota to rising salinity levels and implications for saline water management: a review. *Australian Journal of Botany*. 51: 703-713.

Jergentz, S.; P. Pessacq; H. Mugni; C. Bonetto & R. Schulz. 2004. Linking in situ bioassays and population dynamics of macroinvertebrates to assess agricultural contamination in streams of the Argentina pampa. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 59: 133-141.

Karraker, N. E. 2007. Are embryonic and larval Green Frogs (*Rana clamitans*) insensitive to road deicing salt? *Herpetological Conservation and Biology*. 2: 35-41.

Kefford, B. J. & D. Nugegoda. 2005. No evidence for a critical salinity threshold for growth and reproduction in the freshwater snail *Physa acuta*. *Environmental Pollution*. 134: 377-383.

Kefford, B. J.; P. J. Papas; L. Metzeling & D. Nugegoda. 2004. Do laboratory salinity tolerances of freshwater animals correspond with their field salinity? *Environmental Pollution*. 129: 355-362.

Kusch, R. J. A. 2018. Hidroquímica y bacteriología de manantiales de relevancia social en el noroeste del Chubut. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. 80 pp.

Ladrera Fernández, R. 2012. Los macroinvertebrados acuáticos como indicadores del estado ecológico de los ríos. *Páginas de información ambiental*. 39: 24-29.

Manzo, L. M.; L. B. Epele; C. N. Horak; A. M. Kutschker & M. L. Miserendino. 2020. Engineered ponds as environmental and ecological solutions in the urban water cycle: A case study in Patagonia. *Ecological Engineering*. 154: 105915.

Martínez Peck, L. 1994. Desarrollo integral del Complejo Recreativo La Zeta. Editado por COPLADE, Esquel, Argentina.

Martínez-Jerónimo, F. & L. Martínez-Jerónimo. 2007. Chronic effect of NaCl salinity on a freshwater strain of *Daphnia magna* Straus (Crustacea: Cladocera): A demographic study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 67: 411-416.

Milanesi Camejo, M. P. 2015. Ensayos agudos con *Erodona mactroides* Bosc, 1801 (Bivalva) del Río de la Plata, Uruguay: sobrevivencia frente a cambios de salinidad y evaluación de tasas de filtración. Tesis de Licenciatura. Universidad de la República Uruguay. 73 pp.

Miserendino, M. L. 1995. Composición y distribución del macrozoobentos de un sistema lotico andino-patagónico. *Ecología Austral*. 5:133-142.

Miserendino, M. L.; A. M. Kutschker; C. Brand; L. La Manna; C. Y. Di Prinzio; G. Papazian & J. Bava. 2016. Ecological status of a patagonian mountain river: Usefulness of environmental and biotic metrics for rehabilitation assessment. *Environmental Management*. 57: 1166–1187.

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

Miserendino, M. L.; R. Casaux; M. Archangelsky; C. Y. Di Prinzio; C. Brand & A. M. Kutschker. 2011. Assessing land-use effects on water quality, in-stream habitat, riparian ecosystems and biodiversity in Patagonian northwest streams. *Science of the Total Environment*. 409: 612–624.

Mor, J-R; S. Dolédec; V. Acuña; S. Sabater & I. Muñoz. 2019. Invertebrate community responses to urban wastewater effluent pollution under different hydro-morphological conditions. *Environmental Pollution*. 252: 483-492.

Mugni, H.; A. Paracampo; M. Solis; S. Fanelli & C. Bonetto. 2014. Acute toxicity of roundup to the nontarget organism *Hyalella curvispina*. Laboratory and field study, *Toxicological & Environmental Chemistry*. DOI: 10.1080/02772248.2014.993641.

Mugni, H.; A. Ronco & C. Bonetto. 2011. Insecticide toxicity to *Hyalella curvispina* in runoff and stream water within a soybean farm (Buenos Aires, Argentina). *Ecotoxicology Environmental Safety*. 74: 350-354.

Nunes, B. S.; F. D. Carvalho; L. M. Guilhermino & G. Van Stappen. 2006. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution*. 144: 453-462.

ONU. 2017. Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2017. Aguas Residuales: El recurso desaprovechado. UNESCO. Francia. 202 pp.

Palmer, A. R. 1992. Calcification in marine molluscs: How costly is it? *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89: 1379-1382.

Peluso, L.; A. Guisto; G. Bulus Rossini; L. Ferrari; A. Salibián & A. Ronco. 2011. *Hyalella curvispina* (Amphipoda) as a test organism in laboratory toxicity testing of environmental samples. *Fresenius Environmental Bulletin* 20: 372–376.

Peluso, M. L. 2011. Evaluación de efectos biológicos y biodisponibilidad de contaminantes en sedimentos del Río de la Plata y afluentes. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata. 170 pp.

Persoone, G.; R. Baudo; M. Cotman; C. Blaise; K. C. Thompson; M. Moreira Santos; B. Vollat; A. Torokne & T. Han. 2009. Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test – Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*. DOI: 10.1051/kmae/2009012.

Ronco, A.; M. C. Díaz Báez & Y. Pica Granados. 2004. Monitoreo ambiental. En G. Castillo Morales ed. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas*. México. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. 23-30 pp.

Saigo, M.; M. Marchese & L. Montalto. 2009. Hábitos alimentarios de *Hyalella curvispina* Shoemaker, 1942 (Amphipoda: Gammaridea) en ambientes leníticos de la llanura aluvial del río Paraná medio. *Natura Neotropicalis*. 40: 43-59.

Sarma, S. S. S.; L. Beladjal; S. Nandini; G. Cerón-Martínez & K. Tavera-Briseño. 2005. Effect of salinity stress on the life history variables of *Branchipus schaefferi* Fisher, 1834 (Crustacea: Anostraca). *Saline Systems*. 1, 4. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-1-4>.

Somma, L.; A. Giusto & L. Ferrari. 2011. Manual de producción de *Hyalella curvispina* en laboratorio. 1° ed. Utopías, 25 p. E-book; ISBN 978-987-1529-86.

Szulkin Dolhartz, D. 2003. Diseño y Planificación de la Reserva Natural Urbana Laguna La Zeta. Tesis de maestría en “Dirección y Planificación Medioambiental”. Universidad de Cádiz. 109 pp.

Truhaut, R. 1975. Ecotoxicology – A New Branch of Toxicology: A General Survey of its Aims Methods, and Prospects. En: McIntyre A. D. & Mills C. F. (Eds.) *Ecological Toxicology Research*. Springer, Boston, MA.

Vandenbergh, G. F.; D. Adriaens; T. Verslycke & C. R. Janseen. 2003. Effects of 17 α -ethinylestradiol on sexual development of the amphipod *Hyalella azteca*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 54: 216-222.

Väinölä R, Witt JDS, Grabowski M, et al (2008) Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia*. 595: 241–255.

Whitacre, D. M (Ed.). 2010. *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Springer. USA. 178 pp.

Zuloaga, F; O. Morrone & M. Belgrano. 2008. *Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur*. *Monographs in Systematic Botany, Missouri Botanical Garden*. 107: 1-3348.

10. ANEXO

Resultados de los análisis estadísticos

Prueba de mantenimiento de las hyalellas en laboratorio y puesta a punto de los ensayos

Tabla 1. Resultados de la prueba de ANOVA bifactorial con interacción con bloques correspondientes a las primeras 48 hs de ensayo, sección 6.1.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SOBREVIDA	12	0,27	0,00	3,90

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	29,88	5	5,98	0,44	0,8090
PLANTA	10,83	1	10,83	0,79	0,4076
AIRE	10,83	1	10,83	0,79	0,4076
BLOQUE	5,41	2	2,71	0,20	0,8254
PLANTA*AIRE	2,80	1	2,80	0,21	0,6665
Error	81,99	6	13,67		
Total	111,87	11			

Tabla 1.1 Resultados del Test de Tukey para el factor planta, sección 6.1.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=5,22236
 Error: 13,6653 gl: 6

PLANTA	Medias	n	E.E.
PRESENCIA	93,80	6	1,51 A
AUSENCIA	95,70	6	1,51 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Tabla 1.2 Resultados del Test de Tukey para el factor aire, sección 6.1.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=5,22236
 Error: 13,6653 gl: 6

AIRE	Medias	n	E.E.
AUSENCIA	93,80	6	1,51 A
PRESENCIA	95,70	6	1,51 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Tabla 2. Resultados de la prueba de ANOVA bifactorial con interacción con bloques correspondientes al día 8 de ensayo, sección 6.1.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SOBREVIDA	12	0,92	0,85	7,71

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2048,95	5	409,79	13,34	0,0034
PLANTA	1088,71	1	1088,71	35,43	0,0010
AIRE	460,04	1	460,04	14,97	0,0083
BLOQUE	457,26	2	228,63	7,44	0,0237
PLANTA*AIRE	42,94	1	42,94	1,40	0,2819
Error	184,38	6	30,73		
Total	2233,33	11			

Tabla 2.1 Resultados del Test de Tukey para el factor planta, sección 6.1.

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=7,83136

Error: 30,7297 gl: 6

PLANTA	Medias	n	E.E.	
AUSENCIA	62,38	6	2,26	A
PRESENCIA	81,43	6	2,26	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Tabla 2.2 Resultados del Test de Tukey para el factor aire, sección 6.1.

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=7,83136

Error: 30,7297 gl: 6

AIRE	Medias	n	E.E.	
AUSENCIA	65,72	6	2,26	A
PRESENCIA	78,10	6	2,26	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Tabla 3. Resultados de la prueba de ANOVA bifactorial con interacción con bloques correspondientes al día 14 de ensayo, sección 6.1.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SOBREVIDA	12	0,90	0,83	20,83

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5721,07	5	1144,21	11,40	0,0051
PLANTA	4354,83	1	4354,83	43,39	0,0006
AIRE	699,21	1	699,21	6,97	0,0386
BLOQUE	598,87	2	299,43	2,98	0,1260
PLANTA*AIRE	68,16	1	68,16	0,68	0,4414
Error	602,15	6	100,36		
Total	6323,22	11			

Tabla 3.1 Resultados del Test de Tukey para el factor planta, sección 6.1.

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=14,15252

Error: 100,3581 gl: 6

PLANTA	Medias	n	E.E.
AUSENCIA	29,05	6	4,09 A
PRESENCIA	67,15	6	4,09 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Tabla 3.2 Resultados del Test de Tukey para el factor planta, sección 6.1.

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=14,15252

Error: 100,3581 gl: 6

AIRE	Medias	n	E.E.
AUSENCIA	40,47	6	4,09 A
PRESENCIA	55,73	6	4,09 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Bioensayos con NaCl.

Tabla 4. Resultados de la prueba de ANOVA bifactorial con interacción con medidas repetidas correspondientes al ensayo de salinidad, sección 6.2.1.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SOBREVIDA	63	1,00	0,90	17,88

Datos desbalanceados en celdas.
Para otra descomposición de la SC
especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	71562,96	34	2104,79	17,40	<0,0001	
TRATAMIENTO_FPP	19838,38	6	3306,40	5,96	0,0029	(TRATAMIENTO_FPP*ID_PP)
TRATAMIENTO_FPP*ID_PP	7765,14	14	554,65	4,59	0,0003	
TIEMPO_FPS	39656,12	2	19828,06	163,92	<0,0001	
TRATAMIENTO_FPP*TIEMPO_FPS..	4303,32	12	358,61	2,96	0,0087	
Error	3387,02	28	120,97			
Total	74949,98	62				

Tabla 4.1 Resultados del Test de Tukey para la interacción de los factores tratamiento y tiempo, sección 6.2.1.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=35,26241

Error: 120,9651 gl: 28

TRATAMIENTO	FPP	TIEMPO	FPS	Medias	n	E.E.	
T_10		T_8		6,27	3	0,00	A
T_10		T_14		6,27	3	0,00	A
T_0,1		T_14		22,23	3	0,00	A B
T_1		T_14		24,43	3	0,00	A B
T_0,25		T_14		31,10	3	0,00	A B
T_0,01		T_14		33,33	3	0,00	A B
T_0		T_14		35,53	3	0,00	A B
T_0,5		T_14		44,43	3	0,00	B C
T_10		T_48		47,93	3	0,00	B C D
T_1		T_8		53,33	3	0,00	B C D E
T_0,25		T_8		75,57	3	0,00	C D E F
T_0		T_8		80,00	3	0,00	D E F
T_0,1		T_8		82,20	3	0,00	D E F
T_0,01		T_8		86,67	3	0,00	E F
T_0,5		T_8		88,87	3	0,00	F
T_0,1		T_48		93,33	3	0,00	F
T_1		T_48		95,53	3	0,00	F
T_0		T_48		95,53	3	0,00	F
T_0,25		T_48		95,53	3	0,00	F
T_0,01		T_48		95,57	3	0,00	F
T_0,5		T_48		97,77	3	0,00	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Bioensayos con NH₄Cl.

Tabla 5. Resultados de la prueba de ANOVA bifactorial con interacción con medidas repetidas correspondientes al ensayo de amonio, sección 6.2.2.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SOBREVIDA	45	1,00	0,85	21,62

Datos desbalanceados en celdas.
Para otra descomposición de la SC
especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	50741,44	24	2114,23	11,41	<0,0001	
TRATAMIENTO_FPP	10595,06	4	2648,77	5,52	0,0131	(TRATAMIENTO_FPP*ID_PP)
TRATAMIENTO_FPP*ID_PP	4799,26	10	479,93	2,59	0,0336	
TIEMPO_FPS	31765,85	2	15882,92	85,72	<0,0001	
TRATAMIENTO_FPP*TIEMPO_FPS..	3581,27	8	447,66	2,42	0,0524	
Error	3705,94	20	185,30			
Total	54447,39	44				

Tabla 5.1 Resultados del Test de Tukey para el factor tratamiento, sección 6.2.2.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=33,98754

Error: 479,9262 gl: 10

TRATAMIENTO	FPP	Medias	n	E.E.
T_30		39,26	9	7,30 A
T_15		54,82	9	7,30 A B
T_10		62,22	9	7,30 A B
T_0		76,30	9	7,30 B
T_5		82,21	9	7,30 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Tabla 5.2 Resultados del Test de Tukey para el factor tiempo, sección 6.2.2.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=12,57538

Error: 185,2972 gl: 20

TIEMPO	FPS	Medias	n	E.E.
T_14		27,55	15	0,00 A
T_8		69,78	15	0,00 B
T_48		91,55	15	0,00 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Bioensayos con aguas contaminadas con planta.

Tabla 6. Resultados de la prueba de ANOVA bifactorial con interacción con medidas repetidas correspondientes al ensayo de aguas contaminadas con planta, sección 6.2.3.2.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SOBREVIDA	45	0,93	0,86	23,04

Datos desbalanceados en celdas.
Para otra descomposición de la SC
especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	45242,25	20	2262,11	15,05	<0,0001	
TRATAMIENTO_FPP	129,56	2	64,78	0,11	0,8999	(TRATAMIENTO_FPP*ID_PP)
TRATAMIENTO_FPP*ID_PP	7303,80	12	608,65	4,05	0,0017	
TIEMPO_FPS	36381,52	2	18190,76	121,05	<0,0001	
TRATAMIENTO_FPP*TIEMPO_FPS..	1427,37	4	356,84	2,37	0,0805	
Error	3606,47	24	150,27			
Total	48848,72	44				

Tabla 6.1 Resultados del Test de Tukey para el factor tratamiento, sección 6.2.3.2.

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=24,03349

Error: 608,6502 gl: 12

TRATAMIENTO	FPP	Medias	n	E.E.
E. MATADERO		51,71	15	6,37 A
E. POST-PTLC		52,32	15	6,37 A
E. ARRIBA		55,57	15	6,37 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Tabla 6.2 Resultados del Test de Tukey para el factor tiempo, sección 6.2.3.2.

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=11,17824

Error: 150,2697 gl: 24

TIEMPO	FPS	Medias	n	E.E.
T_14		21,37	15	5,48 A
T_8		47,84	15	5,48 B
T_48		90,39	15	5,48 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Bioensayos con aguas contaminadas sin planta.

Tabla 7. Resultados de la prueba de ANOVA bifactorial con interacción con medidas repetidas correspondientes al ensayo de aguas contaminadas sin planta, sección 6.2.3.3.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SOBREVIDA	45	0,91	0,84	40,99

Datos desbalanceados en celdas.
Para otra descomposición de la SC
especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	72648,53	20	3632,43	12,37	<0,0001	
TRATAMIENTO_FPP	6098,51	2	3049,25	4,75	0,0303	(TRATAMIENTO_FPP*ID_PP)
TRATAMIENTO_FPP*ID_PP	7710,62	12	642,55	2,19	0,0496	
TIEMPO_FPS	56488,87	2	28244,43	96,18	<0,0001	
TRATAMIENTO_FPP*TIEMPO_FPS..	2350,53	4	587,63	2,00	0,1266	
Error	7048,18	24	293,67			
Total	79696,71	44				

Tabla 7.1 Resultados del Test de Tukey para el factor tratamiento, sección 6.2.3.3.

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=24,69375

Error: 642,5519 gl: 12

TRATAMIENTO	FPP	Medias	n	E.E.
E. POST-PTLC		26,75	15	6,54 A
E. MATADERO		43,56	15	6,54 A B
E. ARRIBA		55,11	15	6,54 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Tabla 7.2 Resultados del Test de Tukey para el factor tiempo, sección 6.2.3.3.

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=15,62683

Error: 293,6742 gl: 24

TIEMPO	FPS	Medias	n	E.E.
T_7		9,79	15	7,66 A
T_4		24,44	15	7,66 A
T_48		91,19	15	7,66 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)