

Tesis Doctoral

# Biodisponibilidad y toxicidad de metales pesados en aguas naturales con características físico-químicas extremas. Bases para su monitoreo y remediación

Casares, María Victoria

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Casares, María Victoria. (2012). Biodisponibilidad y toxicidad de metales pesados en aguas naturales con características físico-químicas extremas. Bases para su monitoreo y remediación. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Casares, María Victoria. "Biodisponibilidad y toxicidad de metales pesados en aguas naturales con características físico-químicas extremas. Bases para su monitoreo y remediación". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Biodisponibilidad y toxicidad de metales pesados en aguas naturales con características físico-químicas extremas. Bases para su monitoreo y remediación**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

**María Victoria Casares**

Director de Tesis: Laura I. de Cabo

Director Asistente: Rafael S. Seoane

Consejero de Estudios: Irina Izaguirre

Lugar de trabajo: Museo Argentino de Ciencias Naturales *Bernardino Rivadavia*

Buenos Aires, 2012

## ***Biodisponibilidad y toxicidad de metales pesados en aguas naturales con características físico-químicas extremas. Bases para su monitoreo y remediación.***

En esta tesis doctoral se presentan los resultados obtenidos en el marco de la aplicación de dos herramientas importantes para ser tenidas en cuenta en el manejo, restauración y monitoreo de ecosistemas acuáticos contaminados por metales pesados: el Modelo del Ligando Biótico y la Fitorremediación, evaluadas en dos aguas naturales de nuestro país con características físico-químicas extremas, como lo constituyen las aguas del Río Pilcomayo, caracterizadas por los elevados valores de sus iones principales como por la gran carga de sólidos que transporta y las aguas del Arroyo Morales, afluente del Río Matanza-Riachuelo, caracterizadas por el elevado pH y elevada concentración de sodio y alcalinidad. El Río Pilcomayo presenta también una gran variación inter-estacional en su caudal que, de acuerdo al análisis realizado, afecta directamente la hidroquímica del río ya que los iones mayoritarios muestran una variación inter-estacional con valores superiores en la estación seca. Los sólidos totales en suspensión son mayores en la estación húmeda y constituyen los principales transportadores de los metales pesados que este río recibe provenientes de la actividad minera en su alta cuenca. El mecanismo determinante del contenido iónico en el agua del Río Pilcomayo en la cuenca baja es la evaporación-cristalización en ambas estaciones.

Dado el efecto directo de la hidroquímica sobre la biodisponibilidad y toxicidad de los metales en los organismos acuáticos, se estudió la toxicidad aguda del cobre, cinc, cadmio y plata en la especie nativa *Cnesterodon decemmaculatus*, en agua del Río Pilcomayo y en agua del Arroyo Morales, que mostró el siguiente patrón: plata>cobre>cadmio>>cinc y en agua del Arroyo Morales; cobre>>cinc. La variable físico-química con mayor influencia sobre la toxicidad de los metales fue la dureza. Se aplicó el Modelo del Ligando Biótico a cada calidad de agua y cada metal para evaluar la validez de una extrapolación inter-específica de la predicción de toxicidad aguda del modelo para la especie *P. promelas*. La extrapolación mostró ser válida sólo para el cobre en agua del Río Pilcomayo, para el resto, el modelo tendió a sobrestimar la toxicidad. Esto podría deberse a las limitaciones del modelo en cuanto al rango de valores de los parámetros físico-químicos con los que ha sido calibrado, a que los individuos empleados en los ensayos constituían estadíos menos sensibles y/ó a la menor sensibilidad de *C. decemmaculatus* respecto a *P. promelas* a la presencia de los metales estudiados.

La especie acuática flotante nativa *Salvinia minima* presentó una gran capacidad para remover nutrientes, cobre y cinc, tanto en medio de cultivo como en un agua natural como el agua del Río Pilcomayo, incrementándose el contenido del metal en la biomasa a mayor concentración del mismo en solución. La remoción de cobre fue fundamentalmente por biosorción. Esto permitiría una recuperación relativamente sencilla del metal removido. Asimismo, esta especie presentó una baja traslocación del metal a la biomasa aérea, evidenciando un efecto protector de la maquinaria fotosintética. Estas características hacen de esta especie una buena elección para el tratamiento de aguas y efluentes con elevados niveles de los nutrientes y metales estudiados.

El trabajo realizado en esta tesis contribuye con la evaluación de herramientas que puedan ser aplicadas, en un futuro, en la generación de una normativa y en el manejo y monitoreo ambiental de las aguas basados en las características propias de nuestras especies y nuestros cuerpos de agua.

**Palabras clave:** hidroquímica, Río Pilcomayo, Arroyo Morales, metales, toxicidad, *Cnesterodon decemmaculatus*, Modelo del Ligando Biótico, *Salvinia minima*, fitorremediación.

## ***Bioavailability and heavy metals toxicity in natural waters with extreme hydrochemical characteristics. Basis for monitoring and remediation.***

This PhD thesis presents the results obtained in the application framework of two important techniques to be taken into account in the management, restoration and monitoring of aquatic ecosystems affected by heavy metals pollution. The Biotic Ligand Model and Phytoremediation, have been evaluated in two natural waters with extreme water quality characteristics, Pilcomayo river water, characterized by its high major ions concentration and high load of total suspended solids and Morales stream, an affluent of the Matanza-Riachuelo River, with high pH and elevated sodium and alkalinity concentration. Pilcomayo river water discharge also presents a marked inter-seasonal variation which, according to the analysis performed, shows a direct effect on the river water chemistry, given that major ions also showed an inter-seasonal variation with higher values during the dry season. Total suspended solids showed the highest values during the wet season. Likewise, solids transport heavy metals that the river receives from the mining activities which take place in the upper catchment. The main mechanism which determines Pilcomayo river water major ions composition in Misión La Paz is evaporation-crystallization during both seasons.

Water chemistry has a direct effect on the bioavailability and toxicity of metals to aquatic organisms. Copper, zinc, cadmium and silver acute toxicity on the native species *Cnesterodon decemmaculatus* was studied in Pilcomayo River and Morales stream waters showing the following toxicity order: silver>copper>cadmium>>zinc and in Morales stream water: copper>>zinc. The water quality variable with highest influence on heavy metals toxicity was hardness. Biotic Ligand Model was run with Pilcomayo river and Morales stream water quality parameters and each metal in order to evaluate a possible inter-species extrapolation of the models acute toxicity prediction for the species *Pimephales promelas*. The extrapolation was valid only for copper in Pilcomayo river water. For the rest of the metals the model tended to overestimate heavy metals toxicity. This overestimation can be owed to the models limitation to the range of values of the water quality parameters with which the model has been calibrated, to the use of an elder life stage and/or to the fact that *C. decemmaculatus* is less sensitive to the metals to which it has been exposed.

The aquatic free floating native species *Salvinia minima* showed a great ability to remove nutrients, copper and zinc in a nutritive solution as well as in Pilcomayo River water. Metal content in biomass increased with metal concentration in solution. Copper was removed mainly by biosorption this would allow the use of a more effective method to recover metals from the biomass. This species also showed a low translocation rate which possibly indicates a protective mechanism of the photosynthetic systems. *S. minima* might be useful in phytoremediation of waters and wastewaters with high levels of nutrients and metals.

The analysis performed in this thesis contributes to the evaluation of techniques which can be applied to the development of regulations and environmental management and monitoring based on the properties of our species and water bodies.

**Keywords:** hydrochemistry, Pilcomayo river, Morales stream, heavy metals, toxicity, *Cnesterodon decemmaculatus*, Biotic Ligand Model, *Salvinia minima*, phytoremediation.

## *Agradecimientos*

Primero y principal estoy muy agradecida a mi directora de tesis la Dra. Laura de Cabo y a mi co-director el Ing. Rafael Seoane que confiaron en mí para la realización de este proyecto. La Dra. de Cabo, con quien he pasado gran parte del tiempo del desarrollo de esta tesis, me ha enseñado, guiado, aconsejado, me ha tenido paciencia. Ambos han sido generosos conmigo sin mostrar un mínimo de egoísmo. Son excelentes personas y profesionales a quienes agradezco de corazón. También agradezco a las profesionales de la cátedra de Química Analítica de la Facultad de Agronomía, la Dra. Alicia F. de Iorio, al técnico químico Cristian Weigandt, quien realizó las lecturas en EAA, a todas las personas que trabajan allí les agradezco por el buen trato y atención que he recibido. Al Ing. Oscar Natale por su confianza y gran aporte en el análisis de resultados y redacción de publicaciones científicas. Al Instituto Nacional del Agua, donde las muestras del Río Pilcomayo fueron centrifugadas. A la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación por facilitarme los datos de caudal del Río Pilcomayo y a la Lic. Jakomin, del mismo organismo, por encargarse de la recolección y el envío de muestras desde Misión La Paz. A la Lic. Romero de la Comisión Trinacional para el desarrollo de la cuenca del Río Pilcomayo por facilitarme el acceso a los datos de calidad de agua del río. Al Area Natural Protegida Dique Ing. Roggero-Municipalidad de Moreno por permitirme la captura de peces. A mis compañeros de trabajo con quienes compartí los últimos dos años, la Lic. Eliana Melignani y sobretodo el Ing. Gabriel Basilico con quien comparto todos los días. A toda la gente que me ha rodeado durante estos años en el museo, desde profesionales con los que he compartido el laboratorio, campañas, como la Dra. García, el técnico encargado del invernáculo Carlos Hernández, quien siempre me ha facilitado el trabajo allí y ha aportado ideas para un mejor desarrollo de los ensayos. Al Dr. Sergio Gómez y la Dra. González Naya por su aporte y consejos para realizar los ensayos de toxicidad en peces. Al fotógrafo Ángel Fusaro por las excelentes fotografías de los ensayos. A Amalia González por la confección del mapa del Río Pilcomayo. Al Dr. Luis Capozzo, quien me contactó con la Dra. de Cabo y siempre se preocupó por mí. Agradezco también a todas aquellas personal que me reencontrado en el museo y que he conocido allí como la Lic. Gabriela Fernández Pepi a quien reencontré en el museo luego de haber sido compañeras de facultad, a la Lic. Laura Carignano, gracias por la buena onda y siempre acordarse de mí. A todo el personal del museo, a sus directivos, personal administrativo y de seguridad.

A todos muchas gracias por la *cordialidad*, el *interés* y la *solidaridad!*

Agradezco también al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y a la Universidad de Buenos Aires por el otorgamiento de las becas y subsidios que posibilitaron el desarrollo de esta tesis.

Por último, y no por ello lo menos importante, agradezco a mi familia, a mis padres y mis hermanos, que son lo más importante que tengo. Su amor incondicional es la piedra donde me apoyo en el camino.

*Dedicada a todas aquellas personas que han hecho posible y me han acompañado durante el desarrollo de esta tesis doctoral*

# Índice

<b>Introducción general.....</b>	<b>1</b>
Objetivo general.....	17
<b>Metodología analítica y experimental</b>	<b>18</b>
1. Análisis físico-químicos en aguas y medios de cultivo .....	19
1.1 Mediciones in situ .....	19
1.2 Mediciones en laboratorio .....	19
2. Ensayos de toxicidad aguda de metales pesados en <i>C. decemmaculatus</i> .....	21
2.1 Procedencia y aclimatación de individuos de la especie <i>C. decemmaculatus</i> .....	21
2.2 Ensayos estáticos de toxicidad aguda de metales pesados .....	21
2.3 Ensayos de tiempo letal de la mediana ( $TL_{50}$ ) .....	23
2.4 Cálculo de la concentración letal de la mediana ( $CL_{50}$ ) .....	24
2.5 Aplicación del Modelo del Ligando Biótico .....	24
<b>Parte I. Análisis inter-estacional de la hidroquímica y la hidrología del Río Pilcomayo</b>	<b>25</b>
1. Introducción .....	26
1.1 Objetivo .....	27
2. Materiales y métodos .....	27
2.1 Área de estudio .....	27
2.2 Caracterización hidrológica del Río Pilcomayo .....	28
2.3 Análisis inter-estacional de los principales parámetros físico-químicos del agua del Río Pilcomayo .....	29
3. Resultados .....	33
3.1 Caracterización hidrológica del Río Pilcomayo .....	33
3.2 Caracterización hidroquímica del Río Pilcomayo .....	36
3.3 Análisis inter-estacional de los principales parámetros físico-químicos del agua del Río Pilcomayo .....	37
4. Discusión .....	43
<b>Parte II. Toxicidad aguda de metales pesados en <i>Cnesterodon decemmaculatus</i> en aguas con características químicas extremas. Evaluación de una extrapolación inter-específica del Modelo del Ligando Biótico</b>	<b>50</b>
<b>Capítulo 1. Toxicidad aguda del cobre en <i>C. decemmaculatus</i> en aguas con características químicas extremas .....</b>	<b>51</b>
1. Introducción .....	51
1.1 Objetivo .....	52
2. Materiales y métodos .....	53



2.1 Ensayo de toxicidad aguda del cobre en <i>C. decemmaculatus</i> en agua del Río Pilcomayo .....	53
2.2 Ensayo de toxicidad aguda del cobre en <i>C. decemmaculatus</i> en agua del Arroyo Morales .....	53
3. Resultados .....	53
3.1 Ensayo de toxicidad aguda del cobre en <i>C. decemmaculatus</i> en agua del Río Pilcomayo .....	53
3.2 Ensayo de toxicidad aguda del cobre en <i>C. decemmaculatus</i> en agua del Arroyo Morales .....	57
4. Discusión .....	59
<b>Capítulo 2. Toxicidad aguda del cinc en <i>C. decemmaculatus</i> en aguas con características químicas extremas .....</b>	<b>65</b>
1. Introducción .....	65
1.1 Objetivo .....	67
2. Materiales y métodos .....	67
2.1 Ensayo de toxicidad aguda del cinc en <i>C. decemmaculatus</i> en agua del Río Pilcomayo .....	67
2.2 Ensayo de toxicidad aguda del cinc en <i>C. decemmaculatus</i> en agua del Arroyo Morales .....	67
3. Resultados .....	68
3.1 Ensayo de toxicidad aguda del cinc en <i>C. decemmaculatus</i> en agua del Río Pilcomayo .....	68
3.2 Ensayo de toxicidad aguda del cinc en <i>C. decemmaculatus</i> en agua del Arroyo Morales .....	72
4. Discusión .....	74
<b>Capítulo 3. Toxicidad aguda del cadmio en <i>C. decemmaculatus</i> en aguas con características químicas extremas .....</b>	<b>79</b>
1. Introducción .....	79
1.1 Objetivo .....	81
2. Materiales y métodos .....	81
3. Resultados .....	81
4. Discusión .....	84
<b>Capítulo 4. Toxicidad aguda de la plata en <i>C. decemmaculatus</i> en aguas con características químicas extremas .....</b>	<b>89</b>
1. Introducción .....	89
1.1 Objetivo .....	90
2. Materiales y métodos .....	90

3. Resultados .....	91
4. Discusión .....	94
<b>Parte III. Estudio de la remediación de aguas con plantas acuáticas flotantes</b> .....	<b>98</b>
<b>Capítulo 1. Remoción de nutrientes e interacción entre <i>Salvinia minima</i> y <i>Lemna gibba</i>: efecto sobre el crecimiento en distintos medios de cultivo .....</b>	<b>99</b>
1. Introducción .....	99
1.1 Objetivo .....	100
2. Materiales y métodos .....	100
3. Resultados .....	104
4. Discusión .....	107
<b>Capítulo 2. Remoción de nutrientes y cobre por <i>Salvinia minima</i>. Análisis de compartimentalización del metal en la biomasa .....</b>	<b>110</b>
1. Introducción .....	110
1.1 Objetivo .....	112
2. Materiales y métodos .....	112
2.1 Ensayo de remoción de cobre y nutrientes por <i>S. minima</i> en medio de cultivo ...	113
2.2 Ensayo de remoción y compartimentalización de cobre por <i>S. minima</i> en agua del Río Pilcomayo .....	116
3. Resultados .....	118
3.1 Ensayo de remoción de cobre y nutrientes por <i>S. minima</i> en medio de cultivo ...	118
3.2 Ensayo de remoción y compartimentalización de cobre por <i>S. minima</i> en agua del Río Pilcomayo .....	123
3.3 Comparación entre ensayos .....	126
4. Discusión .....	126
4.1 Remoción de nutrientes .....	126
4.2 Remoción de cobre .....	128
<b>Capítulo 3. Remoción de cinc por <i>Salvinia minima</i>.....</b>	<b>133</b>
1. Introducción .....	133
1.1 Objetivo .....	134
2. Materiales y métodos .....	134
3. Resultados .....	135
4. Discusión .....	136

<b>Conclusiones y consideraciones finales.....</b>	<i>140</i>
<b>Referencias.....</b>	<i>151</i>
<b>Apéndice.....</b>	<i>168</i>

## ***Abreviaturas***

Q: caudal

T°: temperatura

CE: conductividad eléctrica

OD: oxígeno disuelto

COD: carbono orgánico disuelto

STS: sólidos totales en suspensión

STD: sólidos totales disueltos

Me T.: concentración de metal pesado total

Me P.: fracción particulada de metal pesado

Me D.: fracción disuelta de metal pesado

Me-MO: metal asociado a materia orgánica

CL<sub>50</sub>: concentración letal de la mediana

NGPBA: Nivel Guía para la Protección de la Biota Acuática

NID: nitrógeno inorgánico disuelto (amonio+nitratos+nitritos)

PRS: fósforo reactivo soluble

# *Introducción general*

**L**a producción de desechos ha sido una de las características distintivas de la humanidad. Durante miles de años la lucha se centró en las medidas sanitarias, y el principal reto fue la obtención de suministros de agua sin contaminar. Estos problemas se agudizaron a medida que aumentó el número de habitantes y surgió la vida urbana. Pero es recién con el advenimiento de la sociedad moderna (basada en la generalizada actividad industrial y el uso de nuevas tecnologías operadas mediante el uso de combustibles fósiles) que se introdujeron nuevos contaminantes que provocaron y provocan la aparición de nuevos riesgos para la salud humana y el medio ambiente. (Markham, 1994). Después de la Segunda Guerra Mundial, los países industrializados experimentaron un florecimiento económico estimulado por la población en crecimiento, tecnología avanzada y un rápido incremento en el consumo de energía. Durante las décadas de 1950 y 1960 esta actividad incrementó de manera significativa la cantidad de residuos descargados al medio. Al mismo tiempo comenzó a surgir una conciencia pública, instaurándose en la mayoría de los países occidentales, desde finales de los 60 a los finales de los 70, una legislación para controlar varios aspectos de la contaminación (Henry y Heinke, 1999).

De acuerdo con la definición citada por la Agencia Europea de Medio Ambiente (<http://www.eea.europa.eu/>), se denomina polución a la “introducción por parte del hombre de sustancias o energía responsables de causar riesgos a la salud humana, daño a los recursos vivientes y sistemas ecológicos, perjuicio a estructuras ó servicios ó interferencia en el uso legítimo del ambiente”. Si bien el concepto de contaminación no implica la acción del hombre, de aquí en adelante se tratará como sinónimo de polución.

El hombre siempre se ha asentado cerca de cuerpos de agua superficiales donde proveerse de agua y eliminar sus desechos. Casi todas las actividades humanas pueden ejercer un impacto adverso sobre el agua. La calidad del agua se encuentra influenciada tanto por fuentes de contaminación de tipo puntual, como la descarga de aguas residuales municipales, descargas de aguas residuales industriales y de la actividad minera y por fuentes de tipo difusa ó indirecta que provienen, principalmente, de la actividad agrícola-ganadera, de las descargas urbanas y de la contaminación del aire (Ærtebjerg et al., 2003).

Los contaminantes que alcanzan los cuerpos de agua receptores son de diverso tipo, desechos orgánicos, nutrientes, microorganismos patógenos, pesticidas, herbicidas, compuestos orgánicos, metales, ácidos, sales, sedimentos y material suspendido, sustancias radioactivas. En los últimos 30 años, el esfuerzo de los químicos ambientales ha estado dirigido hacia la obtención de un mayor entendimiento de la forma en que se presentan las sustancias químicas en los sistemas acuáticos. Esto es particularmente importante en el caso de los metales, ya que la forma de la especie metálica presente (es decir, la especiación) se ha visto que tiene un efecto directo en el grado en el cual el metal resulta disponible para los organismos (Paquin et al., 2002).

Un *metal pesado* es un miembro de un grupo de elementos no muy bien definido que exhibe propiedades metálicas. Se incluyen principalmente metales de transición, algunos semimetales, lantánidos, y actínidos. Muchas definiciones diferentes han propuesto basarse en la densidad, otras en el número atómico o peso atómico, y algunas en sus propiedades químicas o de toxicidad. El término *metal pesado* es considerado como una "mala denominación" en un informe técnico de la IUPAC debido a su definición contradictoria y su falta de "bases de coherencia científica" (Duffus, 2002), sin embargo, continua utilizándose para identificar al grupo de elementos que a determinadas concentraciones pueden resultar tóxicos para los seres vivos.

En cuerpos de agua receptores, los metales pueden originarse de fuentes naturales (corteza terrestre, emisiones volcánicas) y/o antropogénicas. Algunos metales pesados como el cobre, hierro, manganeso y el cinc, entre otros, constituyen micronutrientes esenciales para animales y plantas, sin embargo, a elevadas concentraciones son tóxicos. Otros metales no esenciales son tóxicos a muy bajas concentraciones. El mayor riesgo de los metales pesados está dado por su persistencia a largo plazo en el medio ambiente. De los 59 elementos metálicos, 13 han sido incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA) (<http://www.epa.gov/>).

De acuerdo con Fairbrother et al. (2007) los metales inorgánicos y compuestos metálicos poseen atributos y comportamientos únicos que deben ser considerados cuando se estudian los riesgos que pueden tener para la salud humana y el medio ambiente. Estos autores describen cuatro principios a considerar:

- Los metales son constituyentes naturales que ocurren en el medio ambiente y varían en concentración a través de distintas regiones geográficas.
- Los distintos ambientes poseen mezclas naturales de metales y los metales usualmente llegan a ellos como mezclas.
- Algunos metales son esenciales para mantener una buena salud en los humanos, otros animales, plantas y microorganismos.
- Los metales, a diferencia de los compuestos orgánicos, no pueden ser creados ni destruidos por procesos químicos ó biológicos; sin embargo, estos procesos pueden transformar los metales de una especie a otra (valencias) y pueden convertirlos entre las formas orgánica e inorgánica.
- La absorción, distribución, transformación y excreción de un metal en un organismo depende del metal, la forma físico-química del metal (especiación) ó compuesto metálico y la habilidad del organismo de regular y/o acumular el metal.

El estudio del efecto de los contaminantes sobre los sistemas naturales ha llevado a la aparición de una nueva disciplina, la Toxicología Ambiental. Durante la etapa temprana, las principales herramientas de la Toxicología ambiental eran la detección de residuos tóxicos en el ambiente ó en los organismos y el análisis de la toxicidad de sustancias químicas en animales no humanos. Sin embargo, constituía un salto muy grande pasar del conocimiento en un animal experimental al medioambiente y la Ecotoxicología se desarrolló de la necesidad de medir y predecir el impacto de contaminantes en poblaciones, comunidades y el ecosistema en su totalidad más que en individuos. Dentro de la Toxicología ambiental puede distinguirse la Toxicología Acuática, con el mismo objeto que la primera sólo que aplicado a organismos acuáticos en varios niveles de organización, desde subcelular hasta los organismos individuales, comunidades y ecosistemas (Wright y Welbourn, 2002).

En un principio, y dada la necesidad de generar regulaciones medioambientales, desde la química se desarrollaron nuevas técnicas para determinar la especiación de



metales en sistemas acuáticos. A su vez, la fisiología estudió cómo los organismos respondían a estresantes y qué efecto producía la presencia de los mismos. Sin embargo, ninguna de estas disciplinas tuvo influencia en la generación de la nueva normativa. Es entonces que los toxicólogos conectaron ambas disciplinas colocando al organismo de prueba en contacto directo con la especie metálica bioreactiva obteniendo así la conexión entre nivel de exposición y efecto, requerida para el desarrollo de criterios regulatorios.

En lo referido a la contaminación por metales en ecosistemas acuáticos, desde la química se vienen desarrollando nuevas técnicas para determinar la especiación de metales. Asimismo, se emplean modelos para este propósito: los modelos cinéticos de acumulación y eliminación y los modelos de equilibrio químico. Al estudiar la química del agua, hay muchas aplicaciones para el estudio del equilibrio químico, una de ellas es la evaluación de los efectos tóxicos de metales disueltos para la biota. El equilibrio químico se establece cuando los reactivos se transforman en productos y los productos se transforman en reactivos simultáneamente y a la misma velocidad, es decir están en equilibrio uno con el otro. Ya en la década del 70, se comprobó que la actividad de la forma iónica libre estaba directamente relacionada con la biodisponibilidad y toxicidad de los metales. Asimismo, se demostró la importancia de la materia orgánica en la mitigación de la toxicidad por metales y la competencia de los iones responsables de la dureza en agua (calcio y magnesio) con los metales por los sitios de unión. Dado que los metales interactúan con el agua de exposición, dichos sitios de unión deben estar en la superficie del organismo. Sin embargo, esto no significa que estos sitios de unión sean los sitios de acción tóxica, se asume que la acumulación del metal en el sitio de acción tóxica es proporcional a la unión a los sitios en el ligando. Estas investigaciones llevaron al desarrollo de modelos como el FIAM (Free Ion Activity Model; Morel, 1983) y el GSIM (Gill Surface Interaction Model; Pagenkof, 1983). En el campo de la fisiología, el entendimiento de la importancia de las branquias en la ionoregulación en peces y la evaluación de los mecanismos de toxicidad de los metales, han demostrado claramente que los metales (como también los protones), incluyendo el cadmio, cobre, plata, cinc y otros tienden a unirse a las branquias en sitios muy específicos. Playle et al. (1992) mostraron que los cationes en solución compiten por un número limitado de

sitios de unión en las branquias y que esta competencia afecta el grado de acumulación de metal en la branquia. Esto permitió analizar la densidad de sitios y calcular constantes de estabilidad, parámetros que pueden ser incluidos en modelos de equilibrio químico y utilizados para predecir los efectos de la interacción entre la concentración, competencia y complejación en la acumulación de metales en las branquias de peces (Playle et al., 1993 para el cobre y cadmio; Janes y Playle, 1995 para la plata).

Dado que los criterios de calidad del agua se comparan comúnmente con la concentración del metal disuelto se pensó que sería más práctico relacionar la concentración del metal disuelto con la toxicidad aguda (letal). Esto, sumado a la creciente evidencia que indicaba que los ensayos realizados en laboratorio en aguas de referencia no resultaban indicativos de lo que ocurría en aguas naturales generó el contexto para el surgimiento de modelos. Así es que Di Toro et al. (2000) y Santore et al. (2001) han propuesto el **Modelo del Ligando Biótico** (BLM, siglas en inglés) como una herramienta para evaluar cuantitativamente la manera en que la química del agua afecta la especiación y biodisponibilidad de los metales pesados en los ecosistemas acuáticos.

El BLM está basado en el supuesto que los metales, en sus formas iónicas libres, compiten con otros cationes por unirse al *ligando biótico* (en peces, la branquia) con capacidades y afinidades específicas. Dentro de un marco de equilibrio geoquímico, el modelo incorpora la competencia que se produce entre las formas metálicas libres con los cationes presentes en los medios naturales (calcio, magnesio, sodio, potasio, protones) y la complejación de los metales por ligandos abióticos (materia orgánica disuelta, carbonatos, cloruros, sulfatos y sulfuros, Figura 1). La complejación la calcula aplicando códigos de especiación geoquímica como el CHESS (Santore y Driscoll, 1995) ó el MINEQL+ (Schecher y McAvoy, 1994). De esta forma predice la concentración de la forma iónica libre. La conexión con el efecto tóxico se hace asumiendo que la concentración disuelta letal de la mediana ( $CL_{50}$ ), la cual varía con la química del agua, se encuentra siempre asociada a un nivel crítico fijo de acumulación del metal en el ligando biótico. Esta acumulación letal fija que produce el 50 % de mortalidad, referida como acumulación letal de la mediana ( $AL_{50}$ ), es la concentración del complejo metal-ligando biótico que se encuentra asociada con el 50 % de mortalidad

y se asume que es constante, sean cuales fueren las características químicas del agua (Meyer et al., 1999).

Cabe destacar que si bien se ha demostrado que la forma iónica libre constituye la especie química de mayor toxicidad, la  $CL_{50}$  a 96 horas ( $CL_{50\ 96-h}$ ) que predice el modelo constituye la concentración de metal en solución requerida para producirse una acumulación en el ligando biótico igual a la  $AL_{50}$ . Por lo tanto, el BLM incorpora así la toxicidad que pueden ejercer otras formas químicas disueltas del metal (Paquin et al., 2002).

### Esquema del Modelo del Ligando Biótico

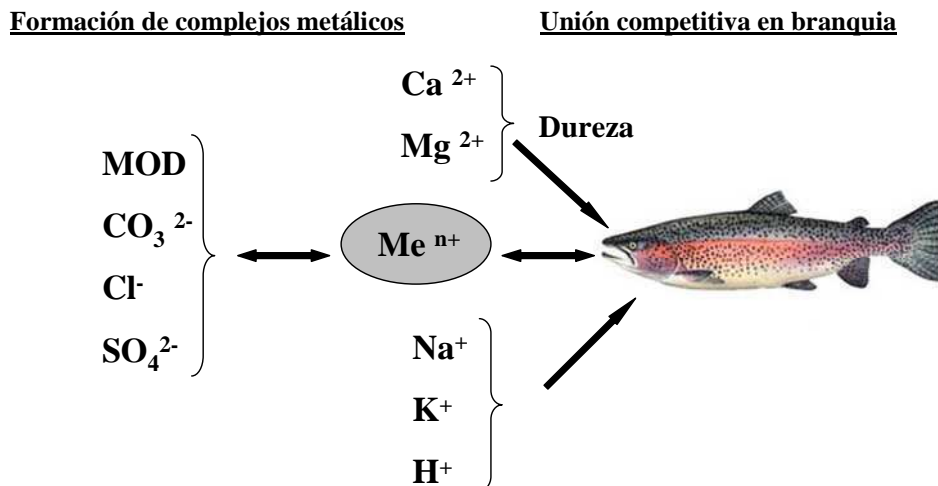


Figura 1. Descripción esquemática del marco conceptual del BLM.

Los metales también pueden adsorberse sobre las partículas en suspensión que naturalmente son transportadas por los ríos. Por lo tanto, la presencia de material en suspensión es un importante factor en la disponibilidad de los metales por su gran capacidad de adsorción de especies iónicas, reduciendo así la concentración de metales en solución (Tao et al., 2000). Sin embargo, los sólidos mismos y/o los metales adsorbidos a ellos podrían tener un efecto tóxico. En este sentido, Natale et al. (2007) han informado una mayor toxicidad del cobre en *D. magna* en ensayos realizados en

aguas con una elevada concentración de sólidos en suspensión respecto de ensayos realizados en aguas libres de sólidos. El BLM considera que el metal adsorbido al material en suspensión (mineral u orgánico) no es biodisponible y, por lo tanto, no lo considera en el análisis. Se encuentra disponible, sin embargo, otra versión del modelo, el BLM-MONTE, que permite estimar la toxicidad del metal total incorporando la concentración de los sólidos en suspensión.

El termino BLM fue introducido de manera que los conceptos y resultados de los modelos “en branquias” pudiesen ser generalizados (Niyogi y Wood, 2004) y es así que varios modelos han sido generados para distintas especies y no sólo para toxicidad aguda (letal), sino también para modelar toxicidad crónica.

Hasta el momento, la versión original del BLM ([http://www.hydroqual.com/wr\\_blm.html](http://www.hydroqual.com/wr_blm.html)) ha sido desarrollada para dos especies de peces del hemisferio norte, trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y cabezón (*Pimephales promelas*); tres especies de invertebrados acuáticos (*Daphnia magna*, *Daphnia pulex* y *Ceriodaphnia dubia*) y cuatro metales (cobre, cinc, cadmio y plata).

El BLM posee las siguientes aplicaciones: a) predice la  $CL_{50\ 96-h}$  para los organismos y metales para los cuales se encuentra calibrado, en la calidad de agua especificada, b) predice un valor de  $CL_{50\ 96-h}$  en otros organismos siempre y cuando se halla estimado la concentración de acumulación letal de la mediana ( $AL_{50}$ ), en invertebrados se ha aplicado como índice de la  $AL_{50}$  la carga de metal en la totalidad del cuerpo (Niyogi y Wood, 2004) y c) permite obtener un valor de Criterio de Calidad de Agua (CCA) para el Cu en el agua especificada. La US EPA en la revisión del año 2007 del Criterio de Calidad del Cobre para la Protección de la vida Acuática, ha recomendado el uso del BLM para el cálculo a partir los datos de calidad de agua obtenidos *in situ* de dicho criterio.

Los datos de concentración-efecto aplicados en la evaluación del riesgo ecológico usualmente provienen de ensayos de toxicidad sobre una única especie en los que se mide los efectos sobre los individuos. Para lograr una mejor aproximación al estudio de los efectos de los tóxicos sobre entidades más complejas como las poblaciones, comunidades y ecosistemas, se ha propuesto la evaluación de la

Distribución de la Sensibilidad de las Especies (DSS). Es decir, la información ecotoxicológica para varias especies es ajustada a una distribución del tipo lognormal ó log-logística (Newman et al., 2000). La influencia de los factores abióticos puede introducir variabilidad y/o desvios en la comparación de la sensibilidad entre especies frente a la presencia de un tóxico. La DSS, incorporada a la evaluación del riesgo ecológico, se basa en la ampliación de la base de datos ecotoxicológicos. Una forma de normalizar esta base es asumir que los BLMs pueden extrapolarse entre grupos taxonómicos similares, es decir, los BLMs desarrollados, por ejemplo, para *P. promelas*, pueden ser aplicados a datos toxicológicos de otras especies de peces. La base para una extrapolación inter-específica es la presunción que los parámetros que describen las interacciones entre cationes (particularmente, calcio, magnesio y protones), el ion metálico libre y el ligando biótico son similares entre organismos y que sólo la sensibilidad intrínseca varía entre especies (Schlekat et al., 2010). La evaluación de posibles extrapolaciones inter-específicas del BLM se ha analizado en los últimos años. Schlekat et al. (2010) estudiaron la extrapolación inter-específica de modelos del ligando biótico para la toxicidad crónica del níquel y De Schamphelaere y Janssen (2010) han analizado la extrapolación entre phyla del modelo del ligando biótico para la toxicidad crónica del cinc.

Por otra parte, los valores de los parámetros físico-químicos que requiere el BLM para calcular la especiación del metal, la cantidad que puede asociarse a los sitios del ligando biótico y predecir la toxicidad, están acotados a un rango dado por el tipo de aguas utilizadas en los ensayos experimentales a partir de los cuales se desarrolló el modelo. De allí la importancia de evaluar el poder predictivo del modelo para valores extremos de los principales parámetros físico-químicos del agua que determinan la biodisponibilidad y toxicidad de los metales y sobre todo contrastar sus predicciones con resultados obtenidos en aguas naturales.

Existe un único trabajo previo en el que se ha aplicado el BLM a ensayos de toxicidad realizados en aguas naturales de nuestro país. Natale et al. (2007) realizaron ensayos de toxicidad aguda del cobre sobre *D. magna* en aguas del Río Pilcomayo y del Río Matanza-Riachuelo. Un buen modelo para el estudio de una posible extrapolación inter-específica del BLM lo constituye la especie *Cnesterodon decemmaculatus*

(Jenyns, 1842). Es una especie nativa de Sudamérica, encontrándose en Argentina, sur de Brasil, Uruguay. En Argentina se la suele llamar "Madrecita de Agua" o "Madrecita de Río" ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)). Es muy común en charcas y en áreas costeras de bañados, ríos y lagunas pampásicas, y también en ambientes de características muy diferentes en casi toda la Argentina, hacia el sur hasta la provincia de Río Negro (Menni, 2004). Las madrecitas de agua son peces de tamaño pequeño, crecimiento rápido y de período de reproducción breve. Asimismo, es una especie muy fácil de mantener en condiciones de laboratorio. Estas características hacen que sean consideradas buenos modelos experimentales en biología y toxicología (Molero y Pisanó, 1987) y previamente han sido utilizadas en ensayos de toxicidad (de la Torre et al., 1997, 2005; Ferrari et al., 1998; Gómez et al., 1998; Villar et al., 2000). *P. promelas*, una de las especies para las cuales ha sido desarrollado el BLM, es una especie holártica que se distribuye desde Canadá hasta Méjico. La longitud máxima reportada es de 10,1 cm y la estándar, 7,3 cm. De climas templados a subtropicales, habita en arroyos, riachuelos, charcas y también se la encontró en lagos. Al igual que *C. decemmaculatus*, tolera condiciones de turbidez, calor, baja concentración de oxígeno, arroyos intermitentes, que no son toleradas por la mayoría de las especies (<http://www.fishbase.org/summary/Pimephales-promelas.html>). Debido a su relativa resiliencia y gran número de crías producidas, la US EPA indica su uso en la evaluación de la toxicidad aguda y crónica de muestras de agua y sustancias químicas en vertebrados acuáticos (Quinn, 1990).

Los cuerpos de agua que reciben efluentes de distintos tipos no presentan los mismos valores en sus parámetros físico-químicos, no se encuentran en el mismo contexto ambiental, no están sometidos al mismo régimen de precipitaciones, algunos serán cuerpos lóticos otros lénticos. Lo importante de estas variaciones es que afectarán de distinta forma la especiación de los contaminantes y, por ende, su biodisponibilidad y consiguiente toxicidad. Por lo tanto, el análisis del efecto de un contaminante en un ecosistema acuático, de los metales pesados en particular, no estaría completo si no se tuviese en cuenta el régimen hidrológico de los cuerpos de agua receptores y su influencia sobre la química del agua.

La cantidad y calidad de los constituyentes mayoritarios de las aguas naturales están condicionadas por distintas fuentes y procesos como la meteorización, el aporte

atmosférico, lavado de suelos orgánicos, las aguas subterráneas, la actividad antrópica, el balance evaporación-precipitación (Conzonno, 2009). De la misma forma, los diferentes regímenes hidrológicos están asociados con importantes variaciones en la química del agua y en el caso de contaminantes como los metales pesados estos procesos son altamente importantes ya que afectan la especiación y, por ende, la biodisponibilidad de estos contaminantes (Smolders et al., 2004).

Los ríos de tierras áridas, es el caso del Río Pilcomayo en nuestro país, constituyen un claro ejemplo de cuerpos de agua con una marcada variación estacional en su caudal. En estos sistemas, los procesos de evaporación y dilución tendrían un importante efecto sobre los principales parámetros físico-químicos del agua. El Río Pilcomayo, particularmente, también se caracteriza por transportar una gran cantidad de sólidos en suspensión, los cuales pueden disminuir en forma importante la biodisponibilidad de los contaminantes por procesos de adsorción de los mismos a las partículas. Por otra parte, los ríos de grandes llanuras con clima húmedo a sub-húmedo como la Llanura Pampeana, donde la escasa pendiente no fuerza el movimiento horizontal del agua o escurrimiento, donde predomina la recarga de los acuíferos y encharcamientos y donde el régimen de precipitaciones no presenta estaciones tan marcadas como en ríos de tierras áridas, el régimen hidrológico afectará de distinta forma los principales parámetros físico-químicos del agua.

Los resultados obtenidos tanto de la ecotoxicología como del estudio de las variaciones en la química del agua y su consiguiente efecto sobre la biodisponibilidad de los contaminantes se traducen en estándares ó criterios de calidad de agua, que variarán de acuerdo al uso que se le dé a la misma. Asimismo, las herramientas derivadas de los estudios ecotoxicológicos, como el BLM, son aplicables en planes de monitoreo que evalúen el éxito de la aplicación de distintas técnicas en procesos de restauración ecológica.

De acuerdo con Davies y Slobodkin (2004) se denomina Restauración Ecológica al “proceso de restaurar uno ó más procesos ó atributos de un paisaje que son apreciados”. En el contexto de la restauración de la calidad del agua de distintos cuerpos de agua es necesario entender cómo están relacionados los procesos físicos, químicos y biológicos que determinan dicha calidad (US EPA, 2012). En este sentido, es conocido

el importante aporte de los humedales naturales y vegetación riparia en la retención de contaminantes y reducción de la concentración de materia orgánica y alcalinidad, entre otros atributos. Es más, en los últimos 20 años, un interés considerable ha sido expresado sobre el uso potencial de estos sistemas biológicos naturales para contribuir también en la purificación de efluentes de una forma controlada.

Los humedales artificiales de tratamiento, son sistemas que han sido diseñados y construidos para utilizar los procesos naturales que involucran a la vegetación del humedal (plantas vasculares y algas), sustrato y los ensamblajes microbianos asociados (fundamentalmente bacterias) para contribuir en el tratamiento de efluentes. Los mecanismos disponibles para mejorar la calidad del agua son varios e interrelacionados. Asimismo, los humedales artificiales ofrecen diversas ventajas en cuanto a costo-eficiencia y técnicamente constituyen un enfoque factible para el tratamiento de efluentes y escorrentía ya que son menos costosos en su construcción, operación y mantenimiento, toleran fluctuaciones en el flujo y carga de contaminantes, pueden constituir hábitat para la vida silvestre y mejoran la estética de espacios abiertos.

Al uso de plantas y los microorganismos asociados a ellas para el tratamiento *in situ* de suelos contaminados, aguas y sedimentos se lo denomina **Fitorremediación**. Esta tecnología hace uso de los procesos naturales por los cuales las plantas y la flora microbiana de su rizósfera degradan y/o secuestran contaminantes orgánicos e inorgánicos (Pilon-Smits, 2005).

Entre los contaminantes inorgánicos, un aporte significativo a la contaminación de las aguas superficiales en todo el mundo lo constituyen el nitrógeno y el fósforo. Estos elementos son críticos para el crecimiento de las plantas pero pueden ser tóxicos y causar cambios drásticos en el ecosistema a elevadas concentraciones. La entrada de estos compuestos a los cuerpos de agua ocurre naturalmente como parte de sus respectivos ciclos, contribuyendo a la eutrofización gradual. Como resultado, el crecimiento de las especies vegetales aumenta, lo que constituye el principal factor en la transformación gradual de muchos sistemas acuáticos (Smith et al., 1999; Frey et al., 2006).



La actividad antrópica puede acelerar y alterar el ciclo de los cuerpos de agua en un proceso denominado *eutrofización cultural* (Sagrario et al., 2005). La eutrofización tiene por principal consecuencia la reducción de la concentración de oxígeno en el agua producto del incremento de la actividad de los organismos descomponedores. Asimismo, las mismas plantas pueden resultar perjudiciales. La dominancia de ciertas especies puede cubrir la superficie no permitiendo la penetración de la luz solar e inhibiendo así la fotosíntesis en el seno del cuerpo de agua. Pueden producirse floraciones algales de las que ciertas especies pueden resultar tóxicas por la liberación de toxinas cuando son consumidas ó mueren (Frey et al., 2006). La reducción del oxígeno disuelto, el incremento de la concentración de amonio y la presencia de floraciones pueden llevar a la reducción de las poblaciones de peces y otras especies sensibles generando cambios a nivel de la comunidad (Schenker y Harfmann, 2010).

En cuanto a los contaminantes inorgánicos metálicos, todas las plantas tienen la capacidad de acumular metales esenciales (calcio, cobalto, cobre, hierro, potasio, magnesio, manganeso, molibdeno, sodio, níquel, selenio, vanadio y cinc) ya que son necesarios para sus principales funciones fisiológicas. Algunos constituyen macronutrientes, como el calcio, magnesio y el potasio y otros son micronutrientes, como el resto de los metales especificados (Taiz y Zeiger, 2010). Los niveles de los metales esenciales tanto inferiores como superiores a los requeridos para el normal desarrollo pueden ser perjudiciales. Dado que los metales no pueden degradarse, cuando se acumulan dentro de las células vegetales por encima de los niveles óptimos se ven afectados procesos fisiológicos básicos como la fotosíntesis y la respiración. También pueden causar toxicidad directa por daño a la estructura celular (debido a estrés oxidativo causado por radicales libres) e inhibir enzimas citoplasmáticas. Asimismo, pueden causar efectos tóxicos indirectos por el reemplazo de nutrientes esenciales en los sitios de intercambio catiónico. Los metales no esenciales pueden efectivamente, competir por los mismos transportadores transmembrana usados por los metales esenciales. Esta relativa falta de especificidad en el transporte de iones podría explicar la razón por la que metales no esenciales entran a las células, aún en contra de un gradiente de concentración (Ghosh y Singh, 2005). Por el contrario, déficits de estos metales esenciales producen varios síntomas como puntos necróticos, bordes

distorsionados y clorosis en las hojas que se relacionan con las deficiencias en las síntesis de clorofila, en el caso del zinc y de enzimas de la etapa clara de la fotosíntesis, para el cobre (Taiz y Zeiger, 2010).

Las aguas contaminadas que pueden ser fitorremediadas incluyen las aguas residuales y servidas (nutrientes y metales), agua de escorrentía en campos sembrados (nutrientes, metales, arsénico, selenio, boro, pesticidas y herbicidas), efluentes industriales, lixiviados de rellenos sanitarios, efluentes de la industria minera (metales), plumas en aguas subterráneas (metales y sustancias orgánicas), escorrentía en almacenamientos de carbón (metales) (Pilon-Smits, 2005).

Los procesos físicos y/o biológicos involucrados en la fitorremediación son: el control hidráulico, la fitodegradación, la fitoextracción, la fitoestabilización, la fitovolatilización, la rizodegradación y la rizofiltración (US EPA, 2001).

- El **control hidráulico** es el uso de plantas para una rápida absorción de grandes volúmenes de agua que deben ser contenidos o para el control de la migración subsuperficial.
- La **fitodegradación** es la degradación de los contaminantes en los procesos metabólicos ya sea dentro de la planta, cuando son absorbidos por las raíces ó la degradación puede ser externa a la planta a través de compuestos producidos por la planta (enzimas).
- La **fitoextracción** es la remoción del contaminante a través de las raíces y su traslocación a la parte aérea de la planta.
- La **fitoestabilización** es la inmovilización de un contaminante por absorción y acumulación en las raíces, adsorción a las raíces o precipitación en la rizósfera.
- La **fitovolatilización** es la absorción y transpiración de un contaminante, es decir, la liberación del contaminante ó de una forma modificada del mismo a la atmósfera.
- La **rizodegradación** es la degradación del contaminante a través de la actividad microbiana en la rizósfera.

- La **rizofiltración** es la adsorción o precipitación en las raíces o la absorción por las raíces de contaminantes que están en solución en la rizósfera.

En los humedales artificiales se utiliza una variedad de especies acuáticas emergentes, sumergidas y flotantes. Son especies tolerantes que presentan un rápido crecimiento alcanzando biomásas importantes en poco tiempo. Los géneros más utilizados son los juncos acuáticos (*Typha* sp.), cola de zorro (*Myriophyllum* sp.), los géneros *Elodea* sp., *Azolla* sp., lentejas de agua (*Lemna* sp.), jacinto acuático (*Eichhornia crassipes*), y el género *Spartina* sp. Especies arbóreas de los géneros *Populus* sp. y *Salix* sp. pueden ser sembrados en los bordes de los humedales. En agua salobre, pueden aplicarse ciertas especies del género *Spartina* así como del género *Salicornia* sp y la especie *Distichlis spicata* (Pilon-Smits, 2005).

En el caso de contaminantes inorgánicos, especies flotantes como de los géneros *Eichornia* sp, *Azolla* sp, *Salvinia* sp, y *Lemna* sp son comúnmente utilizadas debido a que presentan una gran capacidad para acumular metales, pueden ser cosechadas y tratadas fácilmente para la recuperación de los metales.

Debido a las diferencias entre las distintas especies en cuanto a la susceptibilidad a la presencia de contaminantes y a la tasa de remoción de los mismos, la dinámica de contaminantes en los humedales puede depender de la composición de la comunidad de plantas (Weis y Weis, 2004). Si bien, algunas plantas tolerantes están ahora disponibles para la restauración de ambientes, existe un continuo interés en buscar plantas tolerantes nativas que se adapten a las condiciones climáticas locales y sean capaces de colonizar ambientes contaminados (Shu et al., 2002).

*Salvinia minima* Baker (Baker, 1886) es un helecho acuático de flotación libre de la familia *Salviniaceae*. La especie es nativa de América del Sur (Caudales et al. 1999) pero ha sido introducida en América del Norte, España, África e India (Jacono, 2003). No posee raíces y tiene una longitud de entre 1 y 4 cm. Posee rizomas horizontales que flotan justo por debajo de la superficie del agua y producen en cada nudo dos hojas flotantes (frondes) y una tercera hoja sumergida que se encuentra modificada en filamentos. Esta especie, como varias especies del género han

demostrado una gran capacidad de remoción de metales pesados (Sen y Mondal, 1990; Maine et al., 2001; Olgúin et al., 2002, 2005); Sánchez-Galván et al., 2008; Nichols et al., 2000). Por su parte, *Lemna gibba* R. perteneciente al grupo de las Lemnaceas, especies conocidas comúnmente como lentejas de agua, se distribuye en zonas cálidas y templadas de todo el mundo (Lahitte et al., 2004). Se reducen a frondes suborbiculares de entre 2 y 6 mm de diámetro que se encuentran, generalmente, reunidas de a tres con una sola raíz. Tanto *L. gibba* como *S. minima* presentan una amplia distribución, elevada tasa de crecimiento y tolerancia a diversas condiciones ambientales, es decir, poseen las características que se buscan en una especie para su utilización en humedales artificiales (de Cabo et al., 2009).

Las plantas que toleran la presencia de grandes cantidades de metales en el ambiente lo hacen por tres mecanismos posibles: la exclusión, la inclusión y la bioacumulación (Baker, 1981). Este último mecanismo presenta una etapa inicial de rápida y reversible de unión del metal (biosorción) seguido por la bioacumulación, proceso lento e irreversible (Wilde y Benemann, 1993).

Dado que las plantas bioacumuladoras de metales pesados tienen interés en lo que respecta a la fitorremediación, el conocimiento del destino de los metales dentro del sistema planta-rizósfera representa un aporte a tener en cuenta en los procesos posteriores a la remoción de metales pesados. El proceso a seguir en la recuperación del metal o en el tratamiento posterior de las plantas dependerá no sólo de la localización del metal en la biomasa (aérea o sumergida) sino también del proceso por el cual fue fitoacumulado (fracción biosorbida y bioacumulada).

El Modelo del Ligando Biótico y la Fitorremediación constituyen dos herramientas importantes a ser tenidas en cuenta en la generación de normativa, manejo y monitoreo ambiental de los ecosistemas acuáticos contaminados por metales pesados, de allí que el estudio de su aplicación a especies y aguas locales, en el caso del BLM y del potencial uso de especies nativas en procesos de fitorremediación contribuirán con la posible aplicación de estas herramientas a nivel local.

***Objetivo general***

En el marco del estudio de la contaminación por metales pesados en cuerpos de agua lóticos con características fisicoquímicas e hidrológicas extremas, el objetivo general de esta tesis fue el de estudiar herramientas que puedan ser aplicadas en el monitoreo y evaluación de los procesos de degradación y restauración de dichos ambientes. En particular se evaluará la posibilidad de una extrapolación inter-específica del BLM a una especie de pez nativo. Asimismo, en el marco del estudio de técnicas aplicables en la restauración de ríos, se estudiará la capacidad de remoción de metales pesados y nutrientes por plantas acuáticas flotantes.

***Metodología  
analítica y  
experimental***

## 1. Análisis físico-químicos en aguas

### 1.1 Mediciones *in situ*

Las siguientes variables fueron medidas *in situ*: temperatura, oxígeno disuelto (OD) (HANNA oxímetro), pH (peachímetro portátil HANNA), conductividad eléctrica (CE) (HANNA conductímetro).

### 1.2 Mediciones en laboratorio

Todas las determinaciones químicas efectuadas en el laboratorio se han realizado en las muestras previamente filtradas a través de filtros de 47 mm de diámetro y 0,45  $\mu$ m de poro Whatman GF/C que se conservaron en frío (4 °C) hasta el momento del análisis.

Las concentraciones fueron determinadas usando los siguientes métodos: fósforo reactivo soluble (PRS) con molibdato ascórbico, nitrato (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) por reducción con sulfato de hidrazina, nitrito (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) por diazotación, según Strickland y Parsons (1972). Amonio (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) fue determinado por el método de indofenol azul a través del método de Chaney y Marbach (1962), alcalinidad (Alc) por volumetría con ácido clorhídrico, de acuerdo a Mackereth et al. (1989). Calcio (Ca<sup>2+</sup>) y magnesio (Mg<sup>2+</sup>) por volumetría con EDTA, sodio (Na<sup>+</sup>) y potasio (K<sup>+</sup>) por fotometría de llama, sulfato (S-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) por turbidimetría y cloruro (Cl<sup>-</sup>) por volumetría con nitrato de plata, según APHA, AWWA, WPCF, (1992). Los sólidos totales en suspensión (STS) se determinaron por gravimetría, carbono orgánico disuelto (COD) de acuerdo a Golterman y Clymo (1969). La concentración de nitrógeno inorgánico disuelto (NID) fue calculada como la suma de amonio, nitrato y nitrito.

Para la medición de metales pesados, se tomaron muestras de agua y medios de cultivo en recipientes de polipropileno debidamente lavados con HNO<sub>3</sub> al 10 % y enjuagados con agua desionizada. Las muestras se acidificaron a pH<2 con HNO<sub>3</sub> al 100% (grado analítico) para su posterior análisis. Previo a la medición de metales pesados en biomasa vegetal, en muestras de agua no filtradas y en medio de cultivo se realizó una mineralización de las muestras. En el caso de las muestras de agua, previo a la mineralización, las mismas fueron preconcentradas por evaporación. La secuencia de

ácidos (grado analítico) aplicados fue HNO<sub>3</sub>:HClO<sub>4</sub>:HNO<sub>3</sub>:HCl. La proporción en que fueron utilizados dependió del tipo de digestión, es decir, si se trataba de biomasa seca ó de agua/medio de cultivo.

El cobre, cinc, cromo, cadmio, plomo, níquel y hierro en las muestras se midieron por espectrofotometría de absorción atómica Perkin Elmer 1100B (Perkin Elmer, Inc. Waltham, MA, USA). La plata se midió por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito y vapor frío Perkin Elmer AAnalyst 800.

La sensibilidad de la espectrofotometría de absorción atómica de llama (EAA) se define como la concentración de metal que produce una absorción de 1%. El límite de detección del instrumento (LDI) se define como la concentración que produce una absorción equivalente al doble de la magnitud de la fluctuación de fondo. Estos límites varían con el instrumento, el elemento a medir, la matriz y la técnica aplicada. El intervalo de concentración optimo es aquel que va desde varias veces la sensibilidad (ó concentración que produce una absorción de 1%) hasta la zona de la curva de Absorbancia versus concentración que comienza a aplanarse. Este intervalo puede extenderse hacia arriba por dilución. (APHA, AWWA, WPCF, 1992).

En EAA la cantidad de energía absorbida es proporcional a la concentración del elemento en la muestra, por lo tanto, es preciso obtener una curva de absorbancia versus concentración. Esta curva se calcula a partir de estándares preparados por dilución de soluciones patrón de reserva.

El número, rango de concentraciones de los estándares utilizados para obtener la curva y los límites de detección del instrumento para cada metal se pueden observar en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Número de estándares, intervalo de concentraciones de los mismos y límites de detección del instrumento (LDI) en la medición de cobre, cinc, cadmio y plata.

	Nº de estándares	Rango (mg/L)	LDI (mg/L)
Cobre	4	0,1-5	0,077
Cinc	4	0,2-5	0,018
Cadmio	5	0,1-2	0,028
Plata	8	0,025-2	0,008



Las concentraciones que resultaron inferiores al límite de detección se las identificó como *no detectables* (ND).

Para obtener la concentración de metal (Me) en muestras digeridas se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Me (mg/L)} = \text{concentración medida} \times \frac{\text{volumen de dilución}}{\text{volumen evaporado}}$$

## 2. Ensayos de toxicidad aguda de metales pesados en peces

### 2.1 Procedencia y aclimatación de individuos de la especie *C. decemmaculatus*

Los individuos utilizados en los ensayos de toxicidad, se capturaron en una cava situada en la Reserva Natural Los Robles, partido de Moreno, Prov. de Buenos Aires. Se trata de cuerpos de agua no impactados cuyos principales parámetros físico-químicos figuran en la Tabla 2. Una vez transportados al laboratorio de Química y Biología del Museo Argentino de Ciencias Naturales *Bernardino Rivadavia*, los peces se mantuvieron en acuarios de 100 litros con agua de clorada, aireación artificial continua y se los alimentó diariamente con alimento escamado comercial.

Las condiciones de pH se mantuvieron en torno a la neutralidad (7,1-7,5) y la temperatura en el rango de 20 a 24 °C. Esta aclimatación se prolongó durante 30 ó más días. En cuanto a la aclimatación al agua del ensayo se realizó lentamente durante 24 horas y consistió en el agregado de pequeños volúmenes del agua de los ambientes estudiados (Río Pilcomayo y Arroyo Morales) hasta que el mayor volumen correspondiese al agua experimental. Esta última aclimatación se realizó en condiciones de laboratorio de manera que fuese también una aclimatación a la temperatura y fotoperíodo del ensayo. El día anterior a cada ensayo y durante el mismo, los individuos no fueron alimentados.

### 2.2 Ensayos estáticos de toxicidad aguda

Los ensayos realizados en el marco de esta tesis han sido ensayos estáticos de toxicidad aguda sin renovación de 96 horas (US EPA, 2002) para proveer información del tipo dosis-respuesta, expresada como la concentración de metal que resulta letal para

el 50 % de los organismos en el ensayo (CL<sub>50</sub>) dentro del periodo de ensayo en agua superficial del Río Pilcomayo y del Arroyo Morales (Parte II).

**Tabla 2.** Principales parámetros físico-químicos del agua de la cava en la que fueron capturados los especímenes de *C. decemmaculatus*.

Parámetro		
T	(°C)	17
pH	UpH	7,86
CE	(µS/cm)	512
OD	mg/L	11,02
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	mg/L	0,0048
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	mg/L	0,0065
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	mg/L	0,0026
PRS	mg/L	0,1406
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	mg/L	14,19
Cl <sup>-</sup>	mg/L	17,537
Alc	mg/LCaCO <sub>3</sub>	292,945
Ca <sup>2+</sup>	mg/L	27,73
Mg <sup>2+</sup>	mg/L	1,81
COD	mg/L	14,06

Los ensayos se llevaron a cabo en acuarios de vidrio de 4 litros de volumen, con aireación continua, temperatura ambiente constante y fotoperíodo natural de laboratorio. El pH no fue ajustado ya que sus valores no excedieron nunca los límites de tolerancia para la especie (González Naya et al., 2005). El agua utilizada en los ensayos de toxicidad proveniente del Río Pilcomayo (ensayos de toxicidad para cobre, cinc, plata y cadmio) fue transportada en frío desde su lugar de origen y posteriormente fue centrifugada (2000 rpm durante 15 minutos) y luego filtrada utilizando filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/C) en el laboratorio. El volumen de agua experimental en cada acuario fue de 2 ó 1 litros. Siempre se mantuvo uno de los acuarios como grupo control, es decir, en las mismas condiciones experimentales, pero sin el agregado de metal. Previo a los ensayos, los acuarios y todo el material de vidrio utilizado fueron lavados con HNO<sub>3</sub> 10% para eliminar cualquier traza de metal de las paredes de los acuarios y posteriormente enjuagados tres veces con agua desionizada. Se colocaron los individuos en los diferentes acuarios (sin distinción de sexo) y se trató de mantener homogéneo el tamaño de los mismos entre tratamientos. Cada cuatro horas, aproximadamente, se realizaron observaciones para detectar mortalidad. Cada vez que se observaba un

individuo muerto, se lo retiraba y se medía la longitud estándar con calibre de manera de obtener, al finalizar el ensayo, una estimación de la longitud estándar promedio de los individuos del mismo. En todos los ensayos, las concentraciones aplicadas de los metales se obtuvieron a partir del pipeteo de soluciones stock realizadas con reactivos de grado analítico. Diariamente se midió temperatura, pH, conductividad eléctrica y oxígeno disuelto. Inmediatamente después del agregado del metal en los distintos acuarios y de la homogeneización, se recolectó una muestra de agua de cada acuario que se fijó con HNO<sub>3</sub> concentrado de grado analítico con objeto de determinar la concentración de metal inicial en solución. La metodología aplicada para la medición de metal se describió más arriba en la presente sección.

Se llevaron a cabo seis ensayos de toxicidad aguda de metales pesados en la especie *C. decemmaculatus*, cuatro en agua del Río Pilcomayo y dos en agua del Arroyo Morales. Si bien las secciones en las que se describe cada ensayo detallan las condiciones experimentales, en la Tabla 3 puede observarse anticipadamente las principales características experimentales de cada uno en cuanto al número de individuos y volumen de agua en cada unidad experimental y al intervalo de concentraciones iniciales medidas.

**Tabla 3.** Breve descripción experimental de los ensayos de toxicidad aguda de metales pesados en *C. decemmaculatus*.

Metal estudiado	Sitio/Fecha	Número de individuos	Volumen de agua experimental (L)	Intervalo de concentraciones (mg/L)
<b>Cobre</b>	Río Pilcomayo/Mayo 2009	10	2	0,06-1,67
	Arroyo Morales/Octubre 2010	5	1,2	0,05-1,93
<b>Zinc</b>	Río Pilcomayo/Mayo 2009	10	2	3,74-26,4
	Arroyo Morales/Octubre 2010	5	1,2	2,62-75,2
<b>Cadmio</b>	Río Pilcomayo/Mayo 2010	10	2	1,01-4,2
<b>Plata</b>	Río Pilcomayo/Septiembre 2009	10	2	0,09-0,28

### 2.3 Ensayos de toxicidad preliminares

Para definir los intervalos de concentraciones del metal a ser empleados en cada ensayo se llevaron a cabo ensayos preliminares en los que se expusieron individuos de

la especie a una o dos concentraciones de cada metal que surgieron de la búsqueda bibliográfica y de la consulta en la base de datos ecotoxicológicos de la US EPA (<http://cfpub.epa.gov/ecotox>) sobre la relación dosis-respuesta en distintas especies de peces. La toxicidad observada en dichas concentraciones se empleó para la determinación de las concentraciones aplicadas en los ensayos definitivos.

#### 2.4 Cálculo de la concentración letal de la mediana

La concentración letal de la mediana ( $CL_{50}$ ) a 24, 48, 72 y 96 horas ( $CL_{50\ 24-h}$ ,  $CL_{50\ 48-h}$ ,  $CL_{50\ 72-h}$ ,  $CL_{50\ 96-h}$ ) en cada ensayo se calculó aplicando el método PROBIT (Finney, 1978) y el programa estadístico StatPlus (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). El cálculo se realizó introduciendo en el programa las concentraciones iniciales medidas, la mortalidad (respuesta) ocurrida en cada una de ellas y el número total de individuos expuestos.

#### 2.5 Aplicación del Modelo del Ligando Biótico

Se aplicó la versión 2.2.3 del Modelo del Ligando Biótico, interfase para Windows (disponible en [http://www.hydroqual.com/wr\\_blm.html](http://www.hydroqual.com/wr_blm.html)) con el objeto de obtener la predicción de toxicidad del modelo ( $CL_{50\ 96-h}$ ) para la especie *P. promelas* y para cada metal estudiado en las aguas experimentales (modo toxicidad). Los parámetros físico-químicos que requiere el modelo son: temperatura, pH, concentración de iones mayoritarios disueltos (calcio, magnesio, sodio, potasio, cloruros y sulfatos), carbono orgánico disuelto, alcalinidad y porcentaje de ácidos húmicos determinados según metodología (APHA, AWWA, WPCF, 1992). En el caso de los sulfuros, se completó con la menor concentración que acepta el modelo dado que si bien aparece para completar, el programa aún no lo toma en cuenta para realizar la estimación. Para cada ensayo, la temperatura y pH con los que se corrió el modelo fueron los valores promedio del ensayo. El resto de las variables correspondieron a los resultados de los análisis de la campaña correspondiente al agua utilizada en el ensayo.

Asimismo, el programa BLM se aplicó en modo especiación a cada una de las concentraciones iniciales medidas de los cuatro metales estudiados para obtener una estimación de la especiación de los mismos en el agua experimental al inicio de los ensayos.



# *Parte I*

*Análisis inter-estacional de la hidroquímica e hidrología del  
Río Pilcomayo*

## **1. Introducción**

El concepto que un río es función del paisaje por donde fluye, ya ha sido afirmado desde hace tiempo por Hynes (1975) y Margaleff (1960). Los ríos reflejan las interacciones de muchos factores bióticos y abióticos, siendo el clima y la geología, las variables forzantes que determinan los patrones de drenaje (Ward, 1994). En ambientes poco disturbados estas variables definen por sí mismas la estructura y la dinámica física, química y biológica de un río. El caudal es un determinante de la estructura de la comunidad en estos ambientes, ya que se relaciona con la morfología del canal, los sedimentos, el transporte de materia orgánica y nutrientes y la permanencia del hábitat entre otros (Ward, 1994). Asimismo, las características físicas y la cantidad y calidad de los constituyentes químicos mayoritarios de sus aguas están condicionadas por procesos como la meteorización, el aporte atmosférico, lavado de suelos orgánicos, aporte de las aguas subterráneas, entre otros. Sin embargo, la mayoría de los ríos del mundo han sido modificados por la acción directa e indirecta del hombre. Los disturbios originados operan sobre los ambientes lóticos con distintas frecuencias e intensidades, lo cual condicionará el efecto sobre las comunidades.

Las diferentes condiciones del régimen hidrológico que se expresan en el caudal están asociadas a importantes variaciones en los principales parámetros físico-químicos de un río. Estos parámetros, a su vez, tienen una gran influencia en el funcionamiento de los ecosistemas y en la biodisponibilidad y toxicidad de distintos contaminantes, entre ellos los metales pesados (Smolders et al., 2004).

El Río Pilcomayo, típico río de tierras áridas, presenta características extremas en la composición de los iones mayoritarios y una extrema variabilidad inter-anual e inter-estacional en el caudal. Asimismo, transporta gran cantidad de sólidos disueltos y en suspensión y en su cuenca alta es receptor de efluentes producidos durante la extracción y procesamiento de diversos minerales (Medina Hoyos y Smolders, 2005). Estas características indican la razón de la elección de este río para su estudio en esta tesis.

### *1.1 Objetivo*

Realizar un análisis inter-estacional de la hidroquímica de un río que presenta características extremas en su régimen hídrico, composición iónica y niveles de sólidos en suspensión, evaluando su efecto sobre la biodisponibilidad y toxicidad de metales pesados.

## **2. Materiales y métodos**

### *2.1 Área de estudio*

Las nacientes del Río Pilcomayo se encuentran localizadas en Bolivia a lo largo del flanco este de los Andes Centrales a 5.000 msn. Fluye con dirección sudeste unos 670 km hasta alcanzar la llanura chaqueña en la frontera entre Bolivia y Argentina (aproximadamente a 400 msn). Antes de su desembocadura en el Río Paraguay, recorre unos 1700 km formando la frontera entre Argentina y Paraguay (Figura 2). En este tramo se convierte en un río de llanura. La longitud total del Río Pilcomayo es de 2.426 km y la cuenca cubre un área de aproximadamente 288.360 km<sup>2</sup> (<http://www.pilcomayo.net/web/>).

La Cuenca del Río Pilcomayo se extiende sobre tres países de Sudamérica: Argentina, Bolivia y Paraguay. La distribución espacial es Cuenca alta, media y baja de Noroeste a Sudeste. Un 44% del área total de la cuenca se encuentra en Paraguay, el 31% en Bolivia y el 25% en Argentina. Se estima que la población total dentro del área de estudio es de aproximadamente 1,5 millones de habitantes (<http://www.pilcomayo.net/web/>).

El llamado "Pilcomayo inferior", parece hidrológicamente desconectado de la cuenca superior. En ese curso llano (el Chaco de Paraguay y Argentina) el río divaga, es decir, no desemboca directamente en el río Paraguay. Esto ocurre por la sedimentación o atarquinamiento, que se ha acelerado durante el s. XX. No se trata de un río endorreico cuyas aguas desaparezcan en algún punto, de lo cual sí hay ejemplos en el mundo, sino que en el lugar en que el río desaparece, todavía fluye un caudal notable

que se extiende formando bañados, constituyendo ecosistemas acuáticos muy importantes para la biota. (<http://www.pilcomayo.net/web/>).

Cerca de sus nacientes el Río Pilcomayo escurre a través del Cerro Rico de Potosí, montaña formada por depósitos de plata, cinc, plomo y estaño muy importantes. La explotación minera de estos depósitos comenzó en 1545, con una explotación muy importante de plata. Las minas situadas en el distrito de El Porco, a 30 km de Potosí, constituyeron los mayores productores de plata en el siglo XVI. Actualmente, este distrito minero es el mayor productor de cinc de Bolivia (Hudson-Edwards et al., 2001).

Desde 1985 se evidenció que el río estaba siendo progresivamente contaminado por las coladas mineras provenientes del distrito minero cercano a Potosí. Estas coladas, que consisten en residuos de la actividad minera, son volcadas en los sistemas ribereños en forma accidental o deliberada. En el año 1996 se produjo un accidente en la mina El Porco que contaminó el río Pilaya y parte del río Pilcomayo produciendo una importante mortandad de peces (Casares et al., 2012). Una fuente de contaminación muy importante en la actualidad proviene de los ingenios donde el metal es procesado. Sus efluentes son volcados en el río sin ningún tipo de tratamiento previo y desde la introducción del método de procesamiento de trituración-molienda y flotación de los minerales, la contaminación crónica del Río Pilcomayo ha crecido constantemente (Smolders et al., 2003). Para 1998 se relevaron 42 plantas ubicadas a lo largo o muy cerca del río de la Rivera con una capacidad total estimada de tratamiento de 1200 – 1500 ton/d (430.000 – 530.000 ton/año), desechando unas 360.000 ton/año de relaves mineros, con alto contenido de plomo, arsénico y otros metales pesados. Los desechos semisólidos, son arrojados directamente a los cursos de agua. De acuerdo a lo reportado por Medina Hoyos y Smolders (2005), las partículas de los desechos mineros, están dentro de las condiciones de régimen erosivo y por supuesto también de transporte en la cuenca alta y media. Así mismo, se observa que en la cuenca baja, las mismas partículas, tienen las condiciones de régimen de sedimentación y deposición.

## *2.2 Caracterización hidrológica*

A partir de datos históricos del caudal diario, otorgados por la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación (SSRH) y disponibles desde el año 1961 al año 2008



(Apéndice, Tabla 2), se confeccionó el hidrograma del Río Pilcomayo. Asimismo, para analizar tendencias en los caudales medios anuales y en los caudales medios de cada estación en el período mencionado, se aplicó la prueba no paramétrica de Mann-Kendall (MK). Es una prueba basada en el ranking (o número de orden) de dos variables. Es especialmente útil para el análisis de datos que no se ajustan a una distribución normal ó con tendencias no lineales. Sus ventajas radican en que no hay ajuste a ninguna distribución en particular, es robusto frente a datos extremos y presenta un mayor poder respecto a otras pruebas aplicadas comúnmente. La hipótesis nula  $H_0$  establece que los datos  $(x_1, \dots, x_n)$  corresponden a una muestra de  $n$  variables independientes e igualmente distribuidas. La hipótesis alternativa  $H_a$  establece que las distribuciones de  $x_k$  y  $x_j$  no son idénticas para todos  $k, j \leq n$  con  $k \neq j$ . La hipótesis nula se rechaza a un nivel de significancia  $\alpha$  si  $|Z_s| > Z_{crit}$ , donde  $Z_{crit}$  es el valor de la distribución normal estándar con una probabilidad de excederse de  $\alpha/2$ . Un valor positivo de  $Z$  indica una tendencia en alza, mientras que un valor negativo indica una tendencia en baja en la serie de tiempo analizada. Las tendencias estadísticamente significativas son informadas, en este caso, con un nivel de significancia del 3% ( $\alpha = 0,03$ ). El estadístico  $Z$  es usado como una medida de magnitud de la tendencia ó de su significancia. No constituye una cuantificación directa de magnitud de la tendencia (Pelliciotti et al., 2007).

En capítulos posteriores se describirán ensayos de toxicidad realizados en agua del Río Pilcomayo muestreada en el mes de mayo del 2009 (caudal medio mensual de 123,64 m<sup>3</sup>/s), mayo del año 2010 (caudal medio mensual de 68,43 m<sup>3</sup>/s) y en el mes de septiembre del 2009 (caudal medio mensual 20,46 m<sup>3</sup>/s). Para caracterizar hidrológicamente dichas fechas de muestreo se estimaron los percentiles  $P_5$ ,  $P_{25}$ ,  $P_{50}$  y  $P_{75}$  para los caudales medios mensuales de mayo y septiembre en el periodo 1961-2008.

### *2.3 Análisis inter-estacional de los principales parámetros físico-químicos del Río Pilcomayo*

La Comisión Trinacional para el desarrollo de la cuenca del Río Pilcomayo (CTRP) conjuntamente con la SSRH llevan adelante un programa de monitoreo de la calidad de agua del Río Pilcomayo. Mensualmente realizan muestreos en sitios ya definidos, uno de ellos es Misión La Paz (Figura 2) situado en la Provincia de Salta (22°

22' 45" S – 62° 31' 08" O; 254 snm). Allí se extiende el puente internacional (Figura 3) que une Argentina con Paraguay.



**Figura 2.** Mapa de la cuenca del Río Pilcomayo con la ubicación del sitio de muestreo (Misión La Paz, Argentina)

Los muestreos regulares y determinaciones *in situ* (temperatura, pH, conductividad eléctrica, oxígeno disuelto, caudal, turbiedad) se encuentran a cargo de personal de la SSRH, del Centro de Ecología Aplicada del Litoral (CECOAL) y de la Universidad de Salta (UNS). Los análisis químicos los realizan la UNS y la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA). Durante el monitoreo y para la realización de los análisis químicos, se tomaron muestras discretas unos 10 cm por debajo de la superficie del agua y por triplicado de las márgenes izquierda y derecha y del canal de navegación. Todas las determinaciones en el agua se realizaron de acuerdo a los procedimientos descritos en la sección de *Metodología analítica y experimental* (página 18).

Para determinar la influencia del caudal en la concentración de los cationes y aniones mayoritarios, en los sólidos disueltos y totales y en la concentración de metales



**Figura 3.** Puente internacional en Misión La Paz, Salta. (Fuente: Comisión Trinacional para el desarrollo de la cuenca del Río Pilcomayo)

totales y disueltos, se utilizaron los datos obtenidos en Misión La Paz, disponibles del año 2003 al 2011 provistos por la CTRP. Para este estudio se han seleccionado sólo aquellas variables que tienen un efecto directo sobre la biodisponibilidad y toxicidad de los metales pesados para la biota como lo son: temperatura ( $T^{\circ}$ ), pH, calcio ( $Ca^{2+}$ ), magnesio ( $Mg^{2+}$ ), dureza, cloruros ( $Cl^{-}$ ), potasio ( $K^{+}$ ), sodio ( $Na^{+}$ ), sulfatos ( $SO_4^{2-}$ ), alcalinidad (Alc), carbono orgánico disuelto (COD), sólidos totales en suspensión (STS) y sólidos totales disueltos (SDT). También se utilizaron datos de concentración total y disuelta de cobre, cinc, plata y cadmio. El metal particulado se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$MP = ([MT] - [MD]) / STS$$

Así como se describió en la sección de *Metodología analítica y experimental* (página 18), aquellas fechas en las cuales la concentración del metal fue menor al límite de detección, se consideraron no detectables.

Los datos de las variables físico-químicas se clasificaron en dos grupos: datos correspondientes a la estación seca (mayo – octubre, invierno y comienzos de la primavera) y datos correspondientes a la estación húmeda (noviembre – abril, verano y

comienzos del otoño) (Apéndice, Tablas 3 y 4). El estadístico  $dm$  (Newey y West, 1987; Newey y McFadden, 1994) fue calculado con el objeto de determinar diferencias significativas entre los valores medios de cada variable en cada estación. Este estadístico está definido como la diferencia entre las medias  $X$  (valor medio de cada variable en la estación seca) e  $Y$  (valor medio de cada variable en la estación húmeda). Debido al número limitado de datos disponibles para cada estación, los desvíos estándar de los errores,  $ES_x$  y  $ES_y$ , fueron estimados aplicando la técnica Bootstrap (Efron y Tibshirani, 1993). El bootstrapping es la práctica de estimar propiedades de un estimador (desvíos estándar de los errores, en este caso) midiendo dichas propiedades cuando se muestrea de una distribución aproximada. Se puede implementar construyendo un número de remuestreos del conjunto de datos observado (de igual tamaño que el conjunto de datos observado), cada uno de los cuales se obtiene por muestreo al azar con reemplazo del conjunto de datos original.

El estadístico  $dm$  se define de la siguiente forma:

$$dm = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{ES_x^2 + ES_y^2}}$$

donde valores de  $|dm|$  mayores a 2 son una indicación de que las medias difieren entre sí.

A los fines de comparar los valores de la concentración disuelta de los metales analizados en el río con los valores del Nivel Guía para la Protección de la Biota Acuática (NGPBA) en agua dulce propuestos por la SSRH, se calculó el valor del NGPBA para cada fecha de muestreo y cada metal. Dado que para el cobre, cinc y cadmio la dureza ejerce un fuerte efecto protector contra la toxicidad de estos metales en organismos acuáticos, el NGPBA propuesto por la SSRH es dependiente del valor de la dureza. En el caso de la plata, el efecto protector de la dureza no resulta tan claro, por lo tanto, la SSRH propone un valor del NGPBA independiente de esta variable.

Las fórmulas propuestas por la SSRH para el cálculo del NGPBA para el cobre, cinc, cadmio y el valor propuesto para la plata son los siguientes (<http://www.hidricosargentina.gov.ar/> de Dic. 2011):

$$\text{NGPBA Cu } (\mu\text{g/L}) \leq e^{0,7625 * (\ln \text{ dureza}) - 1,6320}$$

$$\text{NGPBA Zn } (\mu\text{g/L}) \leq e^{1,1096 * (\ln \text{ dureza}) - 1,2963}$$

$$\text{NGPBA Cd } (\mu\text{g/L}) \leq e^{1,1208 * (\ln \text{ dureza}) - 7,3111}$$

$$\text{NGPBA Ag } (\mu\text{g/L}) \leq 0,028$$

Por último, se seleccionó una fecha, tanto en la estación húmeda como en la seca, con parámetros extremos de las variables físico-químicas estudiadas y se aplicó el BLM en modo especiación a las concentraciones disueltas de los cuatro metales estudiados para obtener una estimación de la especiación de estos metales en tales condiciones extremas.

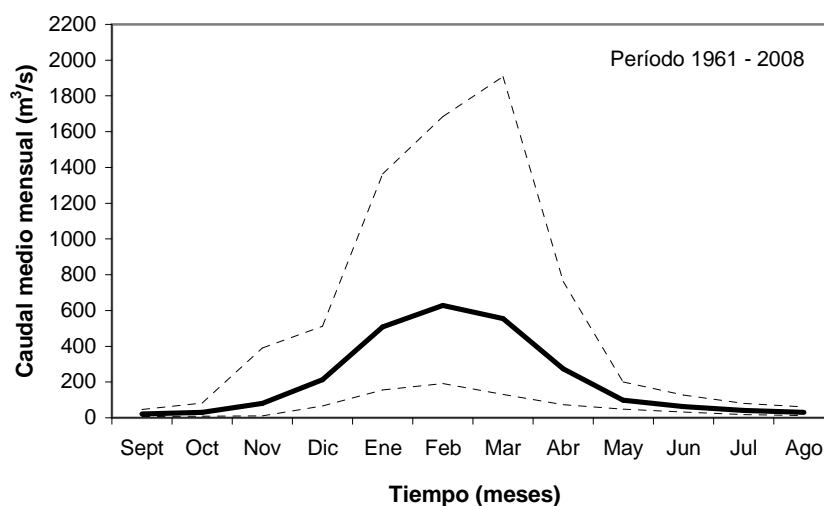
### 3. Resultados

#### 3.1 Caracterización hidrológica

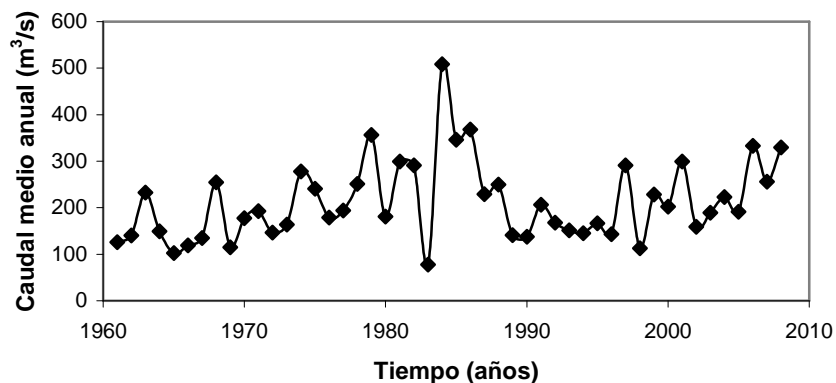
El hidrograma del Río Pilcomayo puede observarse en la Figura 4. El caudal comienza a incrementarse a partir del mes de noviembre, llega a su máximo en febrero y disminuye gradualmente alcanzando valores mínimos en el mes de septiembre. El caudal medio anual en Misión La Paz determinado a partir de datos de los últimos 47 años es 212,1 m<sup>3</sup>/s con un valor máximo de 508,7 m<sup>3</sup>/s y un mínimo de 77,7 m<sup>3</sup>/s. El valor máximo de caudal para el río en este punto fue registrado en el mes de marzo del año 1984, cuando el caudal triplicó su valor medio alcanzando 1908 m<sup>3</sup>/s. El valor mínimo de caudal registrado fue de 7,5 m<sup>3</sup>/s en el mes de septiembre del año 1966.

En la Figura 5 puede observarse una aparente tendencia de aumento en el caudal medio anual en la serie de tiempo estudiada. De acuerdo con el valor del estadístico Z

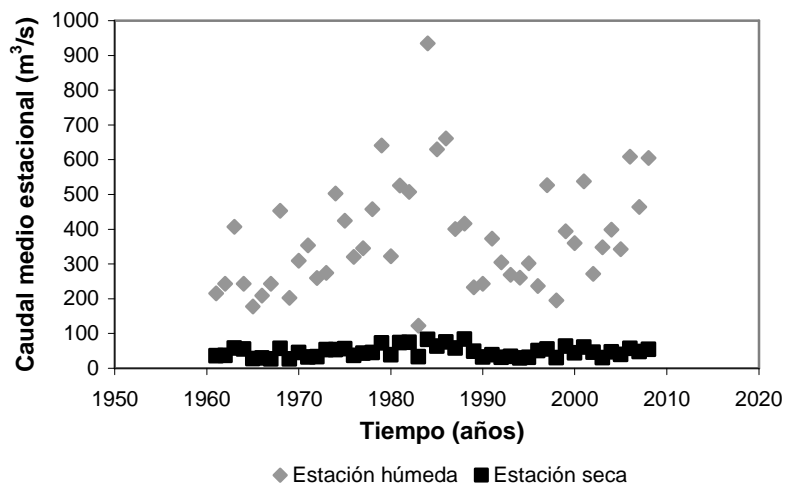
de la prueba de Mann-Kendall aplicada a los valores del caudal medio anual y que puede observarse en la Tabla 4, la tendencia positiva fue significativa con un  $p=0,036$ . La evolución del caudal medio para la estación húmeda y la estación seca en la serie de tiempo estudiada se muestra en la Figura 6. Como puede observarse, durante la estación seca, el caudal parece no haber variado considerablemente en el período estudiado, en cambio, si lo hizo en la estación húmeda. De acuerdo con el valor del estadístico Z de la prueba de Mann-Kendall aplicada al caudal medio de cada estación, el caudal medio de la estación húmeda presentó variaciones significativas ( $p=0,035$ ; Tabla 4). El caudal en la estación seca, por su parte, se mantuvo sin variaciones significativas en el periodo estudiado ( $p=0,32$ ).



**Figura 4.** Hidrograma del Río Pilcomayo en Misión La Paz, Argentina para el período 1961-2008. La línea remarcada representa el caudal medio del río para cada mes del año. Las líneas discontinuas representan los caudales máximos, la superior, y los caudales mínimos, la inferior.



**Figura 5.** Evolución del caudal medio anual del Río Pilcomayo en Misión La Paz en la serie de tiempo estudiada (1961-2008).



**Figura 6.** Evolución del caudal medio del Río Pilcomayo en Misión La Paz en la estación húmeda (◆) y en la estación seca (■) para el periodo estudiado (1961-2008).

**Tabla 4.** Valores del estadístico  $Z$  de la prueba de Mann-Kendall con sus respectivas probabilidades de significancia en porcentaje ( $p$  %) aplicada a los valores del caudal medio anual y caudales medios de la estación húmeda y la estación seca para el periodo 1961-2008 en el Río Pilcomayo.

	$Z$	$p$ (%)
Caudal medio anual	2,09	3,67
Caudal medio estación seca	0,99	32,39
Caudal medio estación húmeda	2,11	3,51

Con el fin de caracterizar los caudales de las fechas (mayo 2009, mayo 2010 y septiembre 2009) en las cuales se tomaron las muestras de agua para realizar los ensayos de toxicidad que se describirán en las Partes II y III de esta tesis, se compararon los caudales medios mensuales correspondientes, con los percentiles (P) calculados para los meses de mayo y septiembre del periodo 1961-2008 (Tabla 5). En mayo 2009, el caudal medio mensual se ubicó cercano al P<sub>75</sub>, en mayo 2010, en cambio, fue cercano al P<sub>25</sub>. En septiembre 2009, el caudal fue levemente superior al P<sub>50</sub>. Por ende, el caudal en mayo 2009 fue medio alto en relación a los meses de mayo de la serie de tiempo estudiada. Por el contrario, en mayo 2010, el caudal fue medio bajo. En septiembre 2009, el caudal presentó un valor medio respecto de los meses de septiembre de la serie de tiempo 1961-2008.

**Tabla 5.** Percentiles (P<sub>5</sub> P<sub>25</sub> P<sub>50</sub> P<sub>75</sub>) calculados para los valores de caudal medio mensual de los meses de mayo y septiembre del periodo 1961-2008 en el Río Pilcomayo.

	Mayo	Septiembre
	m <sup>3</sup> /s	
P <sub>5</sub>	52,08	9,08
P <sub>25</sub>	69,95	15,30
P <sub>50</sub>	96,41	19,89
P <sub>75</sub>	126,08	27,49

### 3.2 Caracterización hidroquímica del Río Pilcomayo

El Río Pilcomayo, es uno de los ríos con mayor concentración de iones principales y sólidos transportados. Comparado con sesenta de los ríos más grandes del mundo (Gaillardet et al., 1999; Apéndice, Tabla 1) puede observarse que el Río Pilcomayo se posiciona en segundo lugar en cuanto a la concentración de sólidos totales en suspensión (7572,6 mg/L), siguiendo al río Huanghe (República Popular China) que transporta 26.900 mg/L. El Río Pilcomayo se encuentra entre los seis ríos con mayor concentración de sodio, siendo similar a la de ríos como el Elbe, el Ebro y el Rhin. El río Pilcomayo, a su vez, se encuentra en el décimo lugar en cuanto a su concentración de calcio, comparable a la de ríos como el Danubio, el Ebro, el Nemanus y el Ron. Se



encuentra en el cuarto puesto por su concentración de magnesio, en el sexto lugar por su concentración de cloruros y en el tercer puesto por sulfatos.

### *3.3 Análisis inter-estacional de los principales parámetros físico-químicos del Río Pilcomayo*

Los valores de las medias, medianas, desvíos estándar (DS), máximos (Max) y mínimos (Min) de los parámetros físico-químicos seleccionados se muestran en las Tablas 6 y 7. En las Tablas 3 y 4 del Apéndice aparecen los valores de los parámetros físico-químicos medidos en cada muestreo según mes y año. En la Tabla 6 puede observarse que el anión con mayor concentración en ambas estaciones fue el sulfato y el catión que estuvo presente en mayor concentración fue el sodio en la estación seca y el calcio en la húmeda. En la estación seca, siguiendo en abundancia a los sulfatos se encontraron los cloruros. Tanto en la estación húmeda como en la estación seca, el ion con menor concentración fue el potasio, con una mediana de 5 y 6,55 mg/l, respectivamente. La concentración de sólidos disueltos en suspensión se duplicó durante la estación seca, reflejando las variaciones de los iones mayoritarios. Los sólidos totales en suspensión aumentaron ocho veces durante la estación húmeda.

De acuerdo con los valores del *dm* en la Tabla 6, puede observarse que el caudal, temperatura, calcio, magnesio, dureza, sulfatos, cloruros, sodio y los sólidos totales disueltos y en suspensión presentaron variación inter-estacional siendo el caudal, la temperatura y los sólidos totales en suspensión superiores durante la estación húmeda. Las variables físico-químicas restantes (calcio, magnesio, dureza, sulfatos, cloruros y sodio) mostraron mayores concentraciones durante la estación seca. La alcalinidad, pH y potasio, por su parte, no mostraron variación entre estaciones (valores de *dm* menores a |2|). En cuanto al carbono orgánico disuelto, no fue posible determinar diferencias significativas en el valor medio entre estaciones debido al reducido número de datos disponibles.

**Tabla 6.** Estadísticos descriptivos para cada estación y valores del estadístico *dm* (diferencia de valores medios entre estaciones) para las variables hidrológicas y de calidad de agua para el Río Pilcomayo en Misión La Paz, Argentina. (Q: caudal, T: temperatura, STS: sólidos totales en suspensión, STD: sólidos totales disueltos, Alc: alcalinidad y COD: carbono orgánico disuelto).

		Q	pH	T	STS	STD	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Dureza	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Alc	Cl <sup>-</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	COD
		m <sup>3</sup> /s	UpH	° C	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L CaCO <sub>3</sub>	mg/L	mg/L CaCO <sub>3</sub>	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
Estación seca	<i>n</i>	17	18	14	17	15	18	16	16	15	16	15	18	18	6
	Media	52,02	7,94	17,7	1419,65	844,92	79,48	36,17	349,71	275,50	126,83	168,18	126,86	6,71	5,27
	Mediana	<b>37</b>	<b>7,91</b>	<b>16,9</b>	<b>1147</b>	<b>847</b>	<b>79</b>	<b>37,75</b>	<b>332,51</b>	<b>278</b>	<b>121,5</b>	<b>187,5</b>	<b>120,5</b>	<b>6,55</b>	<b>5,06</b>
	Max	161,2	8,4	25,8	8181	1114	150,2	52	529,39	399,7	210	243	207	12	10,8
	Min	6,45	7,31	11,8	92	517	44	9,4	148,55	149,5	91	45	70	3,2	2,2
	DS	39,51	0,23	4,14	1905,16	197,91	26,57	10,93	84,71	75,01	27,24	60,26	38,74	2,15	3,09
Estación húmeda	<i>n</i>	14	15	10	15	15	15	12	10	13	13	13	15	15	2
	Media	234,46	7,72	24,41	16676,33	642,46	52,25	22,23	189,99	159,02	106,20	57,72	50,28	5,83	5,9
	Mediana	<b>182,08</b>	<b>7,65</b>	<b>25,8</b>	<b>12499,5</b>	<b>468</b>	<b>44</b>	<b>17,85</b>	<b>184,62</b>	<b>135</b>	<b>100</b>	<b>32</b>	<b>38,79</b>	<b>5,1</b>	<b>5,9</b>
	Max	712,77	8,33	28,2	53960	2725	91	49	370,40	376	182	268	131	9,9	7,8
	Min	6,65	7,27	17,6	240	170	19	3,4	88,90	59	57,6	6,07	18	3,2	4
	DS	194,76	0,29	4,06	16396,26	628,93	21,93	14,59	82,03	91,17	31,01	69,21	30,26	2,31	2,68
<i>dm</i>	-3,8	1,88	-4,36	-2,49	4,07	3,09	4,38	-5,03	4,53	1,41	4,04	5,79	1,07	-	

**Tabla 7.** Estadísticos descriptivos para cada estación y valores del estadístico *dm* (diferencia de valores medios entre estaciones) para las concentraciones total, particulada y disuelta del cobre, cinc, cadmio y plata en agua del Río Pilcomayo en Misión La Paz, Argentina

		Cu T.	Cu P.	Cu D.	Zn T.	Zn P.	Zn D.	Cd T.	Cd P.	Cd D.	Ag T.	Ag P.	Ag D.
		mg/L	µg/kg	mg/L	mg/L	µg/kg	mg/L	mg/L	µg/kg	mg/L	mg/L	µg/kg	mg/L
Estación seca	<i>n</i>	17	16	18	15	12	15	17	11	14	16	11	16
	Media	0,03	51,66	0,002	0,18272	310,38	0,005	0,001	1,47	0,00008	0,002	2,52	0,0008
	Mediana	<b>0,02</b>	<b>27,75</b>	<b>0,002</b>	<b>0,116</b>	<b>124,60</b>	<b>0,003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,72</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,001</b>	<b>1,12</b>	<b>0,00007</b>
	Max	0,18	232,75	0,006	0,968	1168,47	0,03	0,007	5,17	0,0002	0,01	12,35	0,006
	Min	0,007	10,24	0,0002	0,039	27,45	0,001	0,0001	0,07	0,00005	0,0001	0,54	0,00005
	DS	0,04	64,75	0,002	0,23	350,70	0,007	0,001	1,51	0,00003	0,003	3,42	0,002
Estación húmeda	<i>n</i>	14	11	15	13	11	15	15	13	14	15	12	14
	Media	0,16	22,97	0,002	0,78	107,12	0,019	0,004	0,92	0,00009	0,003	0,78	0,0004
	Mediana	<b>0,12</b>	<b>19,21</b>	<b>0,001</b>	<b>0,65</b>	<b>82,66</b>	<b>0,004</b>	<b>0,002</b>	<b>0,41</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,13</b>	<b>0,00009</b>
	Max	0,45	53,78	0,01	2,10	367,94	0,09	0,02	3,95	0,0003	0,01	3,95	0,003
	Min	0,02	2,72	0,0009	0,09	6,87	0,001	0,0001	0,03	0,00005	0,00008	0,02	0,00005
	DS	0,13	18,59	0,002	0,63	105,15	0,02	0,005	1,29	0,00006	0,003	1,30	0,001
<i>dm</i>		3,55	-1,78	0,12	3,46	2,86	1,21	2,56	2,20	0,68	0,86	1,35	-0,70

Aún cuando los valores del estadístico  $dm$  son mayores a  $|2|$  para todas estas variables, el valor mismo indica que tan diferentes son las medias correspondientes. Por lo tanto, puede observarse que las variables que presentaron un mayor cambio inter-estacional fueron los sólidos disueltos totales, el sodio, los sulfatos, los cloruros y, en menor medida, el calcio.

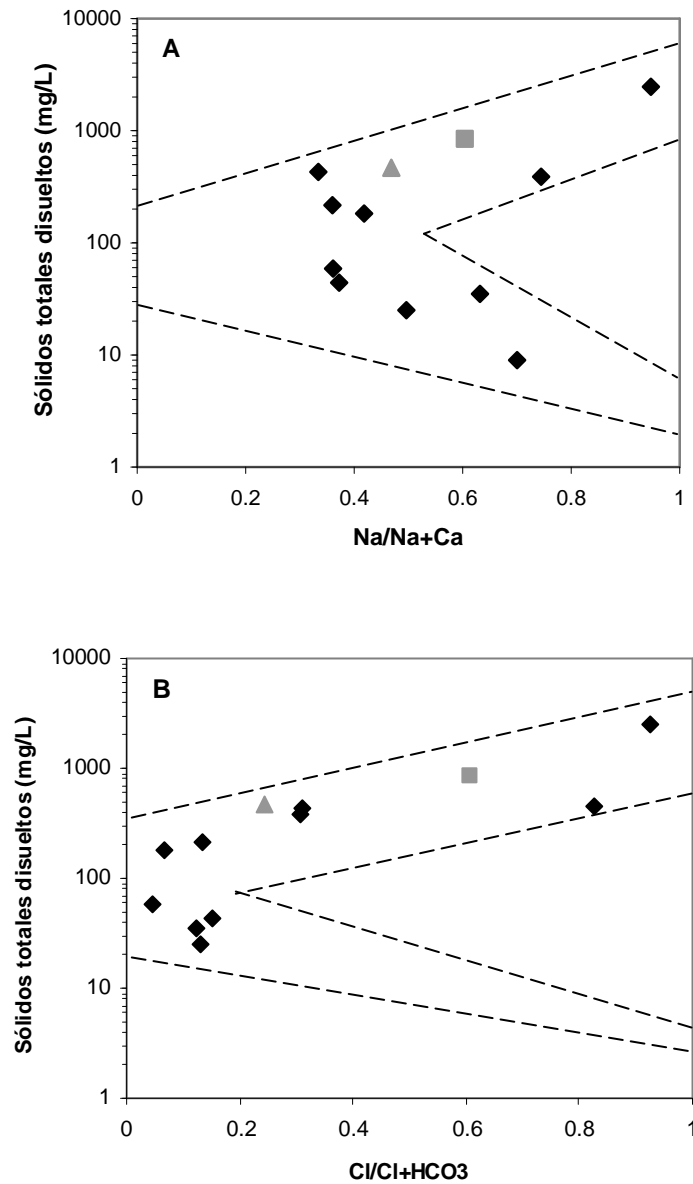
De los cuatro metales pesados estudiados, la fracción total, la particulada y la disuelta indican que el cinc fue el más abundante en el río (en concordancia con su mayor explotación en la actualidad), seguido por el cobre (Tabla 7). Asimismo, y de acuerdo con los valores del  $dm$ , estos dos metales y el cadmio presentaron una variación inter-estacional en la concentración total, siendo ésta superior en la estación húmeda. Por otra parte, la diferencia inter-estacional en la fracción particulada fue importante únicamente para el cadmio y el cinc, siendo superior durante la estación seca. La fracción disuelta de los cuatro metales no varió apreciablemente entre estaciones (valores del  $dm < |2|$ ).

En el caso de la plata, la concentración total, y sobre todo, la concentración disuelta en el río fue no detectable en un gran porcentaje de las fechas de muestreo en ambas estaciones.

La Figura 7 muestra los diagramas de Gibbs en los que se graficaron los sólidos totales disueltos como medida de la salinidad en función de los cationes (calcio y sodio) y de los aniones principales (bicarbonato y cloruros).

En la Figura 7 A y B se observa la química del Río Pilcomayo en ambas estaciones y su comparación con otros ríos del mundo (datos obtenidos de Gaillardet et al., 1999). La composición química del Río Pilcomayo correspondiente a la estación húmeda reveló que la concentración de sólidos totales disueltos es algo inferior respecto de la estación seca. Sin embargo, en ambas estaciones, el valor de esta variable es alto respecto de otros ríos del mundo. En la estación húmeda, la contribución del calcio y el sodio en la química del agua del Río Pilcomayo sería similar, en cambio, en la estación seca la contribución del sodio sería mayor, por lo tanto, las aguas tienden a ser sódicas en dicha estación (Figura 7 A). En cuanto a la contribución de los aniones principales

(Figura 7 B), en la estación húmeda, las aguas son de tipo bicarbonatadas. En la estación seca, en cambio, predominan los cloruros.



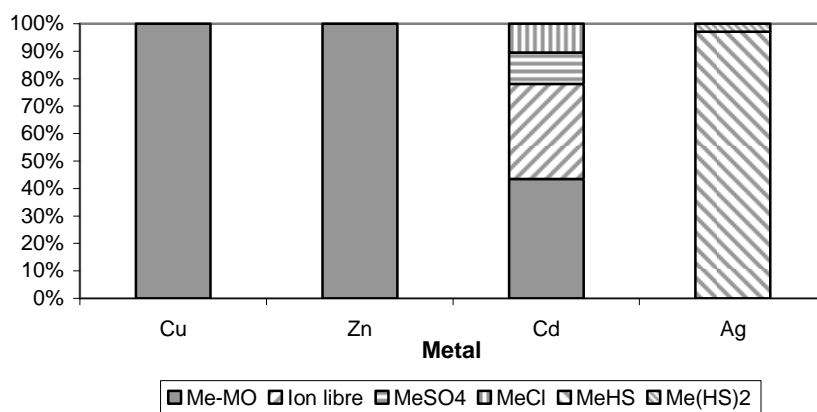
**Figura 7.** Ubicación de la química del Río Pilcomayo en la estación húmeda ( $\blacktriangle$ ) y en la estación seca ( $\blacksquare$ ) en diagramas de Gibbs y comparación con otros ríos del mundo ( $\blacklozenge$ ). Diagrama A: Sólidos totales disueltos en función de los cationes principales y diagrama B, en función de los aniones principales (Gibbs, 1970; Gaillardet et al., 1999).

En las Tablas 5 y 6 del Apéndice puede observarse el valor del NGPBA calculado para cada fecha de muestreo del monitoreo, tanto en la estación seca como en

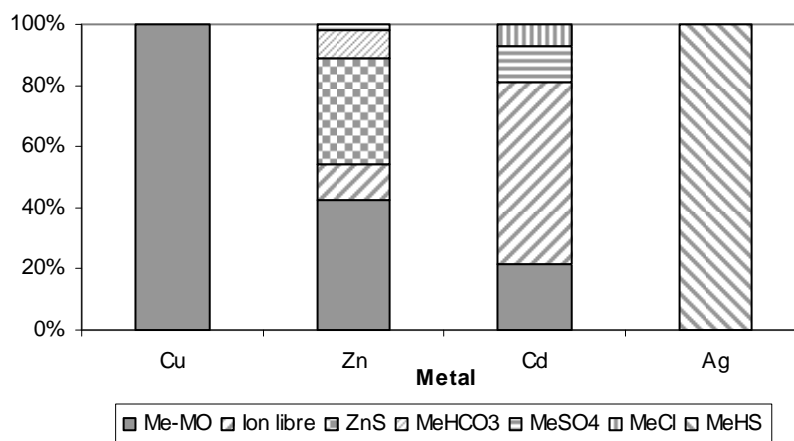
la estación húmeda. En ningún caso la concentración disuelta de cobre, cinc y cadmio superó el valor del NGPBA. En cambio, la concentración disuelta de plata fue superior al NGPBA, en aquellos muestreos en los que se detectó el metal.

Para estimar la especiación de los cuatro metales en condiciones extremas, se seleccionó el muestreo de septiembre del 2009, y el de marzo del 2004, (Apéndice, Tablas 3 y 4). Ambas fechas se caracterizaron por sus caudales extremos y por haberse medido todas las variables. La especiación de los cuatro metales en ambas fechas puede observarse en la Figura 8.

A) septiembre 2009



B) marzo 2004



**Figura 8.** Especiación predicha por el BLM para el cobre, cinc, cadmio y plata disueltos en agua del Río Pilcomayo en los muestreos de (A) septiembre 2009 y (B) marzo 2004.

Según la especiación predicha por el modelo BLM para las condiciones imperantes en el mes de Septiembre del 2009 (Figura 8 A), el cobre disuelto se encontró asociado a materia orgánica (99,35 %), el cadmio se encontró en su forma iónica libre (34,50 %), asociado a materia orgánica (43,35 %), y en menor proporción como  $\text{CdSO}_4$  (11,30 %) y como  $\text{CdCl}$  (10,49 %). La plata, por su parte, se encontró en un 97,06 % como  $\text{AgHS}$  y en un 2,94 % como  $\text{Ag}(\text{HS})_2$ . Por último, el cinc se encontró mayoritariamente como  $\text{ZnS}$  en un 98,75 % y asociado a materia orgánica en un 1,08 %. En el mes de mayo del 2004 (Figura 8 B), el cobre también se halló casi por completo asociado a la materia orgánica (98,42 %). El cadmio, por su parte, se encontró en un 59,31 % como su forma iónica libre, en un 21,39 % asociado a materia orgánica, en un 11,74 % como  $\text{CdSO}_4$  y como  $\text{CdCl}$  en un 7,36 %. La plata se encontró por completo formando  $\text{AgHS}$  (99,69%) y, por último, el cinc se encontró asociado a materia orgánica en un 41,68 %, formando  $\text{ZnS}$  en un 33,97 %, como ion libre en un 11,59 %, como  $\text{ZnHCO}_3$  en un 8,80 % y como  $\text{ZnSO}_4$  y  $\text{ZnCO}_3$  en un 1,88 y 1,34 %, respectivamente.

#### 4. Discusión

El Río Pilcomayo nace y fluye a través de un territorio árido y semiárido en casi toda su extensión para entrar, hacia el final de su recorrido, en una zona subtropical donde su cauce principal se divide formando esteros. Si bien los ríos de tierras áridas son muy variables en su forma, razón por la cual se hace difícil generalizar respecto a sus características (Powell, 2009), el Río Pilcomayo en Misión La Paz podría describirse no como un río efímero (como comúnmente se denominó a los ríos de tierras áridas), ya que su caudal en ningún momento desaparece, sino como un río que experimenta una reducción marcada en su caudal durante la estación seca. En esta estación, el caudal estaría alimentado por el agua subterránea fundamentalmente y por las lluvias, en menor medida (<http://homepages.abdn.ac.uk/c.p.north/pages/DrylandRivers/myths/myths1.php>). Esta alimentación subterránea explicaría los valores de caudal relativamente constantes durante la estación seca.

El análisis estadístico de la presencia de tendencias mostró que el Pilcomayo estaría experimentando un aumento en el caudal medio anual originado posiblemente por un aumento en el caudal durante la estación húmeda. Este aumento sólo podría ser explicado por un aumento de las precipitaciones. Ronchail et al. (1995) reportaron una variación pluridecenal en las precipitaciones en toda Bolivia, siendo los años 1950-1960 más secos y los años 1970-1980 más húmedos. Por otra parte también se conoce que durante las fase negativa del ENSO (El Niño-Southern Oscillation) esta región experimenta un comportamiento opuesto al del sudeste de Brasil y nordeste argentino, es decir, como el norte Sudamericano, padece sequía, y dichos eventos son seguidos por periodos de elevadas precipitaciones. Es más, el máximo valor de caudal medio anual se registró en el año 1984 siguiendo la fase negativa del ENSO registrada durante el año 1983. Sería importante realizar un estudio más exhaustivo de las precipitaciones registradas en la alta cuenca para determinar si efectivamente se ha producido un aumento en las últimas décadas.

El cálculo de los percentiles para los meses de mayo y septiembre permitió establecer que el muestreo llevado a cabo en mayo del 2009 para la realización de los ensayos de toxicidad que se describirán más adelante en esta tesis, correspondió a un mayo con un caudal medio-alto, por lo tanto, los valores de alguno de los parámetros físico-químicos estudiados fueron probablemente inferiores a los que pueden llegar a medirse para condiciones de caudal medio. Lo opuesto ocurrió con el muestreo del mes de mayo del año 2010, en el que el caudal de ese mayo fue medio-bajo, por ende, los valores medidos en dicho muestreo posiblemente fueron menores a los registrados para valores medios de caudal. El muestreo del mes de septiembre del 2009 correspondió a un mes de septiembre con un caudal medio respecto a la serie temporal para ese mes, por lo tanto, los valores de los parámetro físico-químicos estudiados son los que pueden esperarse para dicho período del año en el Río Pilcomayo.

El Río Pilcomayo se caracteriza por un caudal anual relativamente bajo, sin embargo, se posicionó entre los diez ríos con mayor concentración de iones mayoritarios y sólidos en suspensión entre los ríos citados por Gaillardet et al. (1999). La hidroquímica de un río se encuentra determinada por diferentes mecanismos que condicionan la cantidad y la calidad de los constituyentes mayoritarios de sus aguas



(Conzonno, 2009). Básicamente, estos mecanismos son la meteorización, el aporte atmosférico y el proceso de evaporación-cristalización. En el caso del Río Pilcomayo, la marcada variación inter-estacional en el caudal es otro factor que tiene influencia directa sobre la química del agua.

La meteorización consiste en la disolución de sales por acción del agua e involucra reacciones ácido-base, redox, de precipitación-disolución y formación de complejos. Los cuerpos de agua reciben también el aporte atmosférico de sales a través del agua de lluvia ó en forma de aerosoles. Asimismo, la precipitación atmosférica además de incorporar elementos a los cuerpos de agua, puede actuar como factor de dilución. Por el contrario, la evaporación conduce a la concentración de los componentes mayoritarios, favoreciendo la cristalización y precipitación.

El Río Pilcomayo en la cuenca media presentó importantes cambios en la composición físico-química de sus aguas entre la estación seca y húmeda en relación con las diferencias en el caudal. En la cuenca alta del Río Pilcomayo, Smolders et al. (2004) han reportado también una variación inter-estacional en las principales variables físico-químicas. En ambos casos se observó un incremento en la concentración de los iones mayoritarios, a excepción del potasio, durante la estación seca. Este aumento estaría dado por las bajas precipitaciones y elevada evaporación (que se incrementa fuertemente entre junio y octubre). En cambio, durante la estación húmeda se produciría un efecto de dilución originado en las grandes precipitaciones que aportan agua con baja carga iónica (Powell, 2009). De acuerdo a los valores del estadístico  $dm$ , la disminución en la concentración de sodio para caudales elevados y el incremento en condiciones de bajo caudal fueron superiores a las obtenidas para sulfatos, magnesio, cloruros y calcio. Smolders et al. (2004) también habían obtenido mayores diferencias para el sodio respecto de la presentada por sulfatos, calcio y magnesio.

De acuerdo con Smolders et al. (2004) la concentración de calcio y magnesio en el Río Pilcomayo estarían controladas fundamentalmente por la disolución de gipsita ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), dolomita ( $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$ ) y calcita ( $\text{CaCO}_3$ ), sobre todo en la estación húmeda, es decir, según estos autores el mecanismo responsable del contenido de cationes en el agua del Río Pilcomayo sería la meteorización. A partir del análisis de los diagramas de Gibbs realizados, el aporte de calcio y sodio en el Río Pilcomayo en

Misión La Paz estaría dado, en ambas estaciones por la evaporación-cristalización, aunque en la estación húmeda la meteorización podría tener algún tipo de aporte igualando las concentraciones de sodio y calcio. Según Smolders et al. (2004), durante la estación seca, se produciría la precipitación de calcita reduciendo la concentración del calcio en el agua, por lo que las aguas tienden a ser sódicas, como lo indicó el diagrama de Gibbs. Por otra parte, la concentración de sulfatos estaría controlada también por la disolución de gipsita y de minerales sulfurosos como la pirita ( $\text{FeS}_2$ ) contenidos en los efluentes mineros (Smolders et al., 2004). En cuanto a la composición aniónica, los diagramas de Gibbs mostraron un patrón similar, es decir, el principal mecanismo determinante de la composición aniónica del Río Pilcomayo en Misión La Paz sería la evaporación-cristalización con un aporte de meteorización durante la estación húmeda, lo cual produciría aguas más bicarbonatadas. Smolders et al. (2004) reportaron que la concentración de sodio y cloruros estaría dada por la disolución de halita ( $\text{NaCl}$ ). El potasio provendría de la silvita ( $\text{KCl}$ ), es decir, según estos autores la composición aniónica también estaría dominada por la meteorización. Cabe destacar que los resultados obtenidos por Smolders et al. (2004) corresponden a la cuenca alta del Río Pilcomayo, por lo tanto, la química del río estaría reflejando la transformación que tiene el mismo durante su curso, es decir, pasa de un río de montaña a un río de llanura predominando en cada sector de la cuenca los mecanismos propios de dichos tipos de ríos: meteorización en la cuenca alta y evaporación-cristalización con algún aporte por meteorización en la estación húmeda en la cuenca media.

La alcalinidad, el potasio, el carbono orgánico disuelto y el pH no presentaron una variación estacional. Tanto el pH como la alcalinidad están controlados, principalmente, por el sistema de carbono inorgánico. Si bien gran parte de la química en el Río Pilcomayo en Misión La Paz, estaría dada por la evaporación-cristalización, el sistema mantiene la alcalinidad relativamente constante. Otros posibles reguladores del pH y la alcalinidad son los boratos y los silicatos (Conzonno, 2009). La concentración de boro disuelto en aguas del Río Pilcomayo alcanzó una mediana de 0,43 mg/L con un valor máximo de 0,73 mg/L en el periodo de tiempo estudiado. En cuanto a la concentración de silicio en el Río Pilcomayo, Smolders et al. (2004) midieron concentraciones relativamente bajas respecto de otros iones y no presentaría una

variación estacional. Por lo tanto, los silicatos y los boratos no estarían ejerciendo un efecto regulador importante sobre el pH.

Los sólidos totales en suspensión constituyen una variable de gran importancia en el Río Pilcomayo y su aumento es muy marcado durante la estación húmeda. De acuerdo con Medina Hoyos y Smolders (2005), desde su nacimiento hasta Villamontes (500 km) el río tiene una pendiente elevada, siendo la velocidad del agua relativamente alta. Estos factores sumados al terreno escarpado y escasa vegetación favorecen la erosión de los suelos arrastrando grandes cantidades de sólidos y sedimentos “limpios” y contaminados durante la estación húmeda. Al entrar en la región chaqueña, el río se convierte en un río de llanura, con una pendiente sensiblemente menor y mayor vegetación en el terreno, disminuyendo la velocidad de flujo y favoreciendo la sedimentación de los sólidos en suspensión.

La concentración total de los metales pesados en las aguas del Río Pilcomayo fue notablemente superior a la fracción disuelta. En las aguas naturales, las partículas están caracterizadas por la gran diversidad en su composición. Generalmente, están comprendidas por minerales, arcillas, partículas orgánicas entre las que se incluyen organismos, detrito, humus y partículas inorgánicas cubiertas por materia orgánica (Stumm y Morgan, 1970). La superficie de todas estas partículas naturales puede interactuar con protones, oxidrilos e iones metálicos. En este sentido, Windom et al. (1991) reportaron que en los ríos de la costa este de los Estados Unidos, en promedio, el 62, 40, 90 y 80% del cadmio, cobre, plomo y el cinc, respectivamente, son transportados por los sólidos en suspensión. Por lo tanto, los sólidos en suspensión que transporta el Río Pilcomayo, dada su magnitud, ejercen un notable efecto protector para la biota reduciendo la biodisponibilidad de los metales pesados.

Cabe destacar que la concentración disuelta de los cuatro metales no mostró una variación entre estaciones. Lu y Allen (2001), han estudiado la constante de partición para el cobre ( $K_d$ ) en función de la concentración del metal y de los sólidos en suspensión. Los resultados reportados indican que cuando la concentración de sólidos en suspensión es elevada ( $>100 \text{ mg L}^{-1}$ ) la constante  $K_d$  puede considerarse independiente de la concentración de metal. Asimismo, a mayores concentraciones de sólidos en suspensión el  $K_d$  tiende a mantenerse constante. Por lo tanto, en un río con la

carga de sólidos en suspensión como el Río Pilcomayo, probablemente, la partición de los metales entre las fases sólida y líquida es independiente de la concentración y del metal, quedando el metal casi completamente asociado a la fase sólida.

Otras variables físico-químicas analizadas también tienen efectos sobre la biodisponibilidad y la toxicidad. Durante la estación seca, la dureza (la variable con mayor influencia sobre la toxicidad de los metales) aumenta notoriamente, ejerciendo un mayor efecto protector por la mayor competencia del calcio, fundamentalmente, y del magnesio con los iones metálicos por los sitios de unión en los organismos acuáticos. Por otro lado, el pH, importante factor en la determinación de la especiación química de los metales en el medio acuoso, no presentó una variación inter-estacional. Consecuentemente, la especiación entre estaciones no estaría afectada por este factor.

El BLM no tiene en cuenta los sulfuros como variable requerida para predecir la especiación, sin embargo, químicamente los sulfuros se originarían a partir de la elevada concentración de sulfatos, característica de las aguas del Río Pilcomayo y, de acuerdo a la predicción del modelo, tendrían un rol importante fundamentalmente para la especiación y biodisponibilidad de la plata en ambas condiciones estudiadas y del cinc, en condiciones de elevado caudal. En este sentido, el sulfuro inorgánico tradicionalmente no ha sido muy tenido en cuenta como ligando en sistemas acuáticos oxigenados, debido a la inestabilidad del azufre reducido en presencia de oxígeno molecular. Sin embargo, la ocurrencia de sulfuros meta-estables ha sido reportada para una variedad de sistemas marinos y continentales completamente oxigenados y su existencia en estos sistemas se ha atribuido a la estabilización cinética por complejación con hierro, cobre y cinc. Los sulfuros serían ligandos “suaves” que unen fuertemente metales como el mercurio (II), la plata (I), cobre (I) y (II), cinc (II) y hierro (II). Cuando estos metales se encuentran en bajas concentraciones, niveles de sulfuro reactivo del orden de los 0,62-570 nM pueden afectar significativamente su especiación. En particular el mercurio y la plata pueden desplazar al hierro, el cinc y el cobre de los sulfuros metálicos (Bianchini y Bowles, 2002). Entre los datos de las variables físico-químicas suministrados por la Comisión Trinacional para el desarrollo de la Cuenca del Río Pilcomayo, existe una única medición de sulfuros de <0,001 mg/L. El Río Pilcomayo recibe minerales como la pirita, contenidos en los relaves mineros y

efluentes de ingenios, por lo tanto, el rol de los sulfuros en la especiación de los metales pesados es importante en la cuenca alta del río y así lo han reportado Hudson-Edwards et al. (2001). Según estos autores los sulfuros serían, en la alta cuenca, los principales transportadores de los metales en solución. Por otra parte, la especiación de los cuatro metales en las fechas con caudales extremos indicó que la materia orgánica sería un importante agente complejante, principalmente, para el cobre en las dos condiciones de caudal, para el cinc, en caudales bajos y, en menor medida, para el cadmio, en cuya especiación también influyeron las elevadas concentraciones de sulfatos y cloruros, en condiciones de bajo caudal.

En ningún muestreo de los considerados en esta tesis, las concentraciones de cobre, cinc y cadmio superaron los NGPBA. En el caso de la plata, aún valores tan bajos como los límites de detección resultaron superiores al NGPBA propuesto por la SSRH. Sólo en dos fechas la concentración de plata disuelta fue detectable y estas mediciones correspondieron a agosto y octubre del año 2003 en los cuales la concentración de plata disuelta estuvo en el rango de 3 a 7  $\mu\text{g/L}$  superando ampliamente el NGPBA. Esto implica que en Misión La Paz, las concentraciones disueltas de cobre, cinc y cadmio no representan un riesgo para los organismos acuáticos. Dada esta condición, el agua del Río Pilcomayo en Misión La Paz fue utilizada para ensayos estáticos de toxicidad aguda por metales pesados realizados en el marco de esta tesis y que se describen en secciones posteriores. Existen, sin embargo, registros de niveles de metales pesados en la cuenca alta superiores a los NGPBA (Hudson-Edwards et al., 2001). Dado que los metales se encuentran asociados fundamentalmente a los sólidos en suspensión, y teniendo en cuenta que, por el régimen del río, estos sólidos son depositados a lo largo de su curso y fundamentalmente en la zona de bañados y esteros del territorio argentino, es de esperarse que dichos metales queden retenidos en los sedimentos y solamente en determinadas ocasiones, que puedan producir cambios en el potencial redox de los sedimentos, cambios en el pH ó fuerza iónica del agua; los metales podrían pasar a la fracción disuelta.



## *Parte II*

*Toxicidad aguda de metales pesados en *Cnesterodon decemmaculatus* en aguas con características químicas extremas. Evaluación de una extrapolación inter-específica del Modelo del Ligando Biótico.*

## Capítulo 1

### Toxicidad aguda del cobre en *C. decemmaculatus* en aguas con características químicas extremas

#### 1. Introducción

El cobre es un elemento menor en la corteza terrestre. Los minerales típicos que contienen cobre incluyen sulfuros, sulfosales, carbonatos y óxidos (Eisler, 1998).

En soluciones acuosas mayormente esta presente como el catión divalente ( $\text{Cu}^{2+}$ ) ó como hidróxido de cobre y complejos carbonatados. Sin embargo, el cobre no es especialmente móvil en ambientes acuáticos debido a la relativamente baja solubilidad de los sólidos que contienen cobre y la alta afinidad del cobre por las superficies minerales y orgánicas (<http://www.epa.gov/nrmrl/pubs/600r10093/600r10093.pdf>)

Es un metal ampliamente utilizado en la manufactura de textiles, conductores eléctricos, pinturas anti-incrustantes, arreglos de plomería y cañerías, monedas y utensilios de cocina. Compuestos de cobre también se encuentran en pesticidas y fungicidas como ingrediente activo. El sulfato de cobre es utilizado en la industria del metal para la separación del cinc y este compuesto también constituye la fuente más común de cobre en fertilizantes ([http://www.ccme.ca/assets/pdf/pn\\_1270\\_e.pdf](http://www.ccme.ca/assets/pdf/pn_1270_e.pdf)). El cobre es componente de varios medicamentos de uso veterinario (Eisler, 1998).

El cobre es un micronutriente esencial requerido en pequeñas cantidades (5-20  $\mu\text{g}/\text{gr}$ ) por los humanos, otros mamíferos, peces, moluscos, crustáceos y equinodermos para el metabolismo de los carbohidratos y el funcionamiento de más de 30 enzimas. También es necesario para la formación de hemoglobina y hemocianina, los pigmentos transportadores del oxígeno en la sangre de vertebrados y moluscos, respectivamente.

El cobre se almacena en hígado, cerebro, corazón, riñón y músculos. Cuando las concentraciones en el ambiente superan los rangos fisiológicos, puede constituir un

importante tóxico para los organismos acuáticos, particularmente para los peces (Eisler, 1998).

El principal mecanismo de toxicidad del cobre en peces resulta del efecto combinado de una reducción en el flujo de entrada del sodio y un aumento en su flujo de salida, originando una reducción neta en plasma y en todo el organismo. Se cree que la reducción en el flujo de entrada del sodio se encontraría asociada con la unión no competitiva del cobre a la bomba basolateral de sodio, la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, resultando en menores tasas de absorción de sodio. La salida de sodio estaría asociada al daño del epitelio branquial producido por el cobre que resultaría en una reducción de la integridad de las uniones a nivel paracelular, haciendo el epitelio más permeable al sodio interno. Como resultado aumentan la viscosidad y la presión sanguínea, se produce taquicardia y en condiciones agudas, fallo cardíaco produciendo la muerte del pez (Pyle et al., 2003).

De todos los BLMs generados hasta la fecha, el de toxicidad aguda por cobre es el más avanzado. Están disponibles varias versiones, la versión original del modelo desarrollada para peces (Di Toro et al., 2001) y adaptada a dáfnidos (Santore et al. 2001), una versión de toxicidad aguda desarrollada para *D. magna* por De Schamphelaere y Janssen (2002) y una versión refinada de esta última descrita por De Schamphelaere et al. (2002). La versión de Di Toro et al. (2001) y Santore et al. (2001) desarrollada para peces y aplicada en la presente contribución, se ha ido actualizando con resultados de investigaciones posteriores.

Existe en la bibliografía un único trabajo previo en el que se ha evaluado la toxicidad del cobre en *C. decemmaculatus* llevado a cabo por Villar et al. (2000) en un agua sintética blanda. Los autores informaron para individuos adultos de la especie un valor de  $\text{CL}_{50\ 96\text{-h}}$  de 0,155 mg Cu/L.

### 1.1 Objetivo

Comprender los efectos de la química del agua sobre la toxicidad del cobre en un pez nativo *C. decemmaculatus*, y evaluar una posible extrapolación inter-específica del Cu-BLM en aguas superficiales con características químicas extremas a ser tenida en cuenta en una ampliación conceptual del modelo.



## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Ensayos de toxicidad aguda del cobre en *C. decemmaculatus* en agua del Río Pilcomayo

Este ensayo se realizó utilizando el agua colectada durante la campaña realizada en el mes de mayo del año 2009 en Misión La Paz (Tabla 8). Para definir el intervalo de concentraciones a aplicarse en el ensayo, se realizó un ensayo de toxicidad preliminar en el que se expusieron 12 individuos juveniles aclimatados de *C. decemmaculatus* a una concentración nominal de 0,8 mg Cu/L en un acuario con 2L de volumen del agua experimental durante 96 h. Posteriormente, se aplicó un diseño experimental que consistió en siete tratamientos ó concentraciones de cobre más un grupo control sin el agregado del metal. La solución stock utilizada para las distintas concentraciones ensayadas fue de 100 mg Cu/L y el reactivo de grado analítico utilizado fue  $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . El número inicial de peces por acuario fue de 10 y el volumen de agua experimental, 2 L.

### 2.2 Ensayo de toxicidad aguda del cobre en *C. decemmaculatus* en agua del Arroyo Morales

El agua con la que se llevó a cabo este ensayo fue colectada en el Arroyo Morales (afluente del Río Matanza-Riachuelo), cerca de sus nacientes en el partido de Las Heras ( $34^\circ 52' 14,91'' \text{ S}$ ;  $58^\circ 56' 30,41'' \text{ O}$ ) en Octubre del año 2010 (Tabla 8). El diseño experimental consistió en cinco tratamientos ó concentraciones de cobre más un grupo control sin el agregado del metal. En este ensayo el número inicial de peces por acuario fue de 5 y el volumen de agua experimental, 1,2 L. Las concentraciones de cobre aplicadas se obtuvieron de la solución stock de cobre especificada para el ensayo en agua del Río Pilcomayo.

## 3. Resultados

Los principales parámetros físico-químicos del agua colectada en el Río Pilcomayo y en el Arroyo Morales, aparecen en la Tabla 8. Las aguas del Río Pilcomayo presentaron mayor dureza que las del Arroyo Morales, así como fueron

superiores las concentraciones de sulfatos, cloruros y los sólidos totales en suspensión.

La alcalinidad, el pH y el sodio fueron superiores en el Arroyo Morales.

**Tabla 8.** Principales parámetros físico-químicos del agua del Río Pilcomayo y del Arroyo Morales aplicadas en los ensayos de toxicidad. El caudal, temperatura, pH, oxígeno disuelto y conductividad eléctrica corresponden a mediciones *in situ*.

Parámetro	Unidad	Río Pilcomayo	Arroyo Morales
Q	m <sup>3</sup> /s	75,2	-
T	°C	21,5	16
pH	UpH	7,66	8,35
CE	μS/cm	945,3	1255
OD	mg/L	8,9	6,2
Ca <sup>2+</sup>	mg /L	73,33	33,84
Mg <sup>2+</sup>	mg /L	30,5	22,90
Dureza	mg /L CaCO <sub>3</sub>	307,32	178,75
Cl <sup>-</sup>	mg /L	101	19,53
Na <sup>+</sup>	mg /L	65,2	250
K <sup>+</sup>	mg /L	5,1	14,33
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	mg /L	207,3	20,44
COD	mg /L	4,4	11,12
Alc	mg /L CaCO <sub>3</sub>	110	865,63
STS	mg /L	1637	36
STD	mg/L	517	-
Cu T./Cu D.	mg/L	0,07 / 0,001	0,03
Zn T./ Zn D.	mg/L	0,7 / 0,2	0,18

De acuerdo con la ecuación propuesta por la SSRH (Parte I, página 33), el nivel guía para cobre disuelto en agua del Río Pilcomayo sería  $\leq 0,015$  mg/L y  $\leq 0,01$  mg/L, en agua del Arroyo Morales, para la fechas de los respectivos muestreos. En el muestreo realizado en el Río Pilcomayo, la concentración de cobre disuelto se encontró por debajo del nivel guía. En el caso del Arroyo Morales, la concentración medida fue levemente superior el nivel guía.

Todas las variables físico-químicas medidas en el agua del Río Pilcomayo en la fecha de muestreo (Tabla 8), se encontraron dentro del rango para el cual el BLM ha sido calibrado. En el Arroyo Morales, tanto la alcalinidad como la concentración de sodio superaron el valor límite superior para el que el BLM se encuentra calibrado.

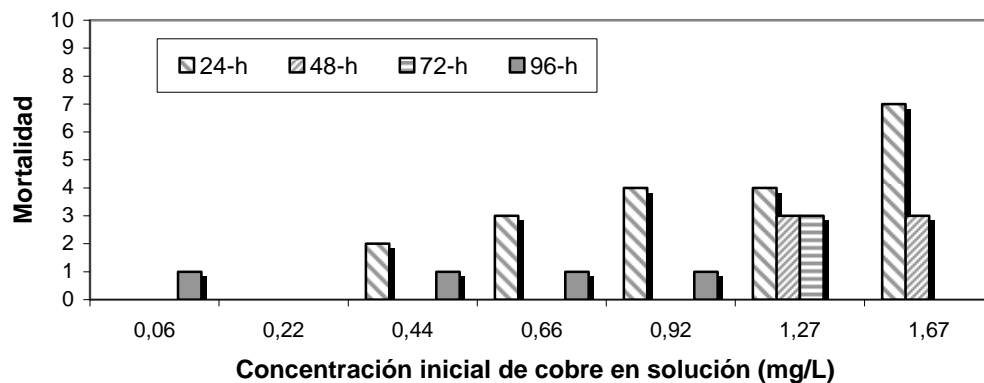
La comparación del caudal medio mensual del mes de mayo del 2009 con los percentiles (P) calculados para los meses de mayo y septiembre del periodo 1961-2008

realizada en la Parte I de esta tesis (página 36), indicó que el caudal medio mensual se ubicó cercano al P<sub>75</sub>, es decir, correspondió a un mes de mayo con un caudal medio-alto.

### 3.1 Ensayos de toxicidad aguda del cobre en *C. decemmaculatus* en agua del Río Pilcomayo

La temperatura y pH medios del ensayo fueron de  $16,8 \pm 1,74$  ° C y  $8,18 \pm 0,13$  UpH, respectivamente. Las concentraciones iniciales de cobre disuelto medidas en los tratamientos fueron: 0,06; 0,22; 0,44; 0,66; 0,92; 1,27 y 1,67 mg Cu/L. La longitud estándar media de los especímenes seleccionados fue de  $18,9 \pm 2,2$  mm.

No se observó mortalidad en el grupo control. El patrón de mortalidad observada en función del tiempo para cada tratamiento se muestra en la Figura 9. Como puede observarse la mayor mortalidad se produjo en las primeras 24 horas del ensayo en casi todos los tratamientos. En las dos concentraciones más elevadas del metal, se produjo mortalidad también a las 48 horas (tratamientos de 1,27 y 1,67 mg Cu/L) y a las 72 horas (tratamiento de 1,27 mg Cu/L).



**Figura 9.** Mortalidad diaria (número de peces sin vida por día) en función de la concentración inicial de cobre en solución en agua del Río Pilcomayo ( $n=10$ )

Los valores de CL<sub>50</sub> a las 24, 48, 72 y 96 h para *C. decemmaculatus* (CL<sub>50</sub> 24-h, CL<sub>50</sub> 48-h, CL<sub>50</sub> 72-h y CL<sub>50</sub> 96-h) con sus correspondientes intervalos de confianza calculados aplicando el método PROBIT se muestran, así como la CL<sub>50</sub> 96-h predicha por el BLM para *P. promelas* en el agua experimental, en la Tabla 9. La CL<sub>50</sub> disminuyó en el tiempo alcanzando un valor de 0,65 mg Cu/L (4,49-0,82) a las 96 horas. Como puede

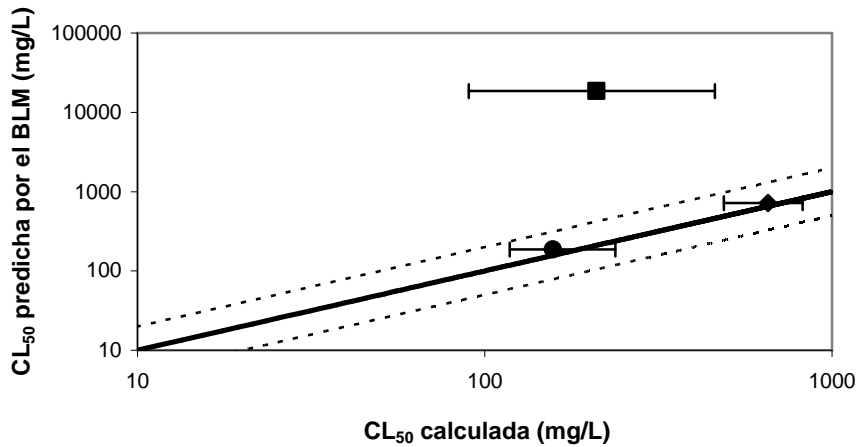
observarse, el valor de  $CL_{50\ 96-h}$  predicho por el BLM para *P. promelas* se encontró dentro del intervalo de confianza del valor calculado para *C. decemmaculatus*.

**Tabla 9.** Concentración letal media de cobre ( $CL_{50}$ , en mg Cu/L) calculada a las 24, 48, 72 y 96-h para *C. decemmaculatus* en agua del Río Pilcomayo y del Arroyo Morales y valor predicho por el BLM ( $CL_{50\ 96-h}$ ) para *P. promelas* en ambos tipos de agua.

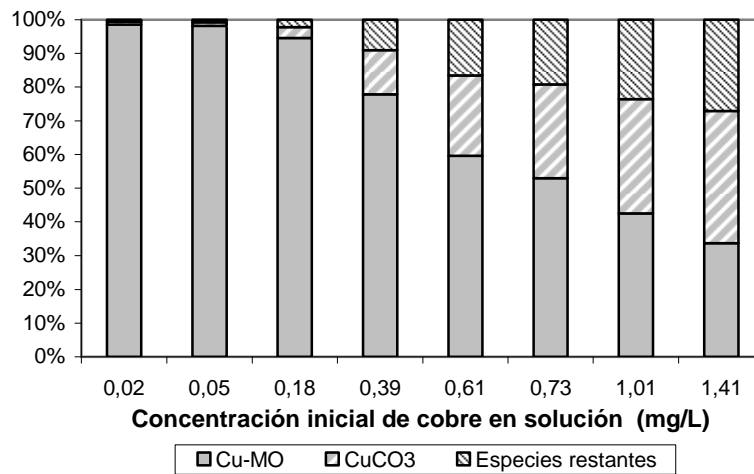
	$CL_{50}$ (mg Cu/L)				BLM
	24-h	48-h	72-h	96-h	
Río Pilcomayo	1,04 (0,24-1,28)	0,79 (0,62-0,96)	0,73 (0,56-0,91)	0,65 (0,49-0,82)	0,72
Arroyo Morales	0,44 (0,15-0,87)	0,39 (0,11-1,33)	0,21 (0,09-0,46)	0,21 (0,09-0,46)	18,61

En la Figura 10 se muestra la  $CL_{50-96\ h}$  predicha por el BLM para *P. promelas* en función del mismo parámetro calculado para *C. decemmaculatus*. La línea continua representa una relación 1:1. Las líneas discontinuas representan predicciones dentro del factor  $\pm 2$ . Las barras de error representan los intervalos de confianza del 95 %. Se considera que la predicción del modelo es precisa respecto a la calculada cuando los valores entran en el rango del factor  $\pm 2$  respecto de la concordancia perfecta. Para este ensayo, como puede observarse en la Figura 10, la predicción del modelo para *P. promelas* fue precisa con respecto a la calculada para *C. decemmaculatus*.

La especiación predicha por el BLM para cada concentración inicial de cobre medida (Figura 11) mostró que la especie  $CuCO_3$  es la segunda en abundancia, luego del cobre asociado a la materia orgánica disuelta (Cu-MO), en el grupo control y en todas las concentraciones hasta 0,73 mg/L y pasó a convertirse en la especie más abundante en las dos concentraciones más elevadas. La contribución de  $CuHCO_3^+$ , entre las especies restantes, fue la mayor y alcanzó un 27 % en los tratamientos con las mayores concentraciones de cobre. Más aún, para estos casos, la fracción carbonatada superó la fracción asociada a materia orgánica disuelta.



**Figura 10.** Toxicidad del cobre ( $CL_{50}$ , en mg Cu/L) calculada para *C. decemmaculatus* por Villar et al. (2000) (●) y en la presente contribución en agua del Río Pilcomayo (◆) y en agua del Arroyo Morales (■) comparadas con la toxicidad del Cu predicha por el BLM para *P. promelas* en los tres ensayos. La línea continua representa una relación 1:1. Las líneas discontinuas representan predicciones dentro del factor  $\pm 2$ . Las barras de error representan los intervalos de confianza del 95 %.



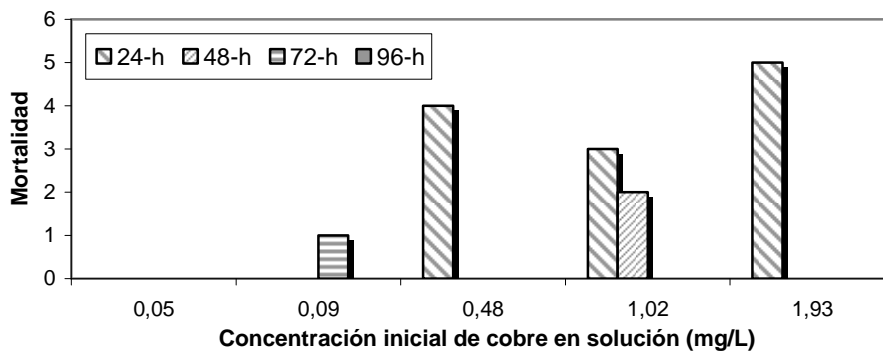
**Figura 11.** Especiación del cobre, predicha por el BLM, para cada una de las concentraciones de cobre medidas y el grupo control en agua del Río Pilcomayo. Las especies de cobre se encuentran expresadas como porcentajes de la concentración total inicial de cobre en solución.

### 3.2 Ensayo de toxicidad aguda del cobre en *C. decemmaculatus* en agua del Arroyo Morales

La temperatura y pH medios del ensayo fueron de  $22,6 \pm 0,8$  °C y  $8,81 \pm 0,33$  UpH, respectivamente. Las concentraciones iniciales de cobre medidas en los distintos

tratamientos fueron: 0,05; 0,09; 0,48; 1,02 y 1,93 mg Cu/L. La longitud estándar media de los individuos fue de  $14,4 \pm 1,8$  mm.

No se produjo mortalidad en el grupo control. El patrón de mortalidad observado en función del tiempo para cada tratamiento se muestra en la Figura 12. Como puede observarse, la mayor mortalidad se produjo durante las primeras 24 horas del ensayo. En el tratamiento de 1,02 mg Cu/L también se produjo mortalidad a las 48 horas.

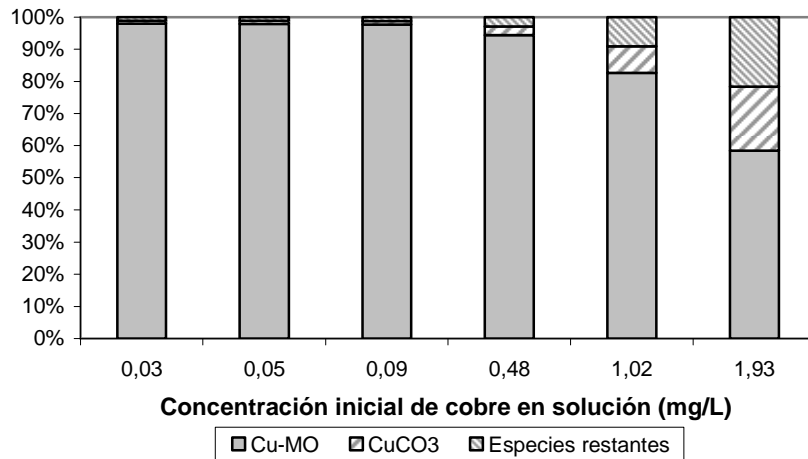


**Figura 12.** Mortalidad diaria (número de peces sin vida por día) en función de la concentración inicial de cobre en solución en agua del Arroyo Morales ( $n=5$ ).

Los valores de  $CL_{50}$  a las 24, 48, 72 y 96 h para *C. decemmaculatus* ( $CL_{50}$  24-h,  $CL_{50}$  48-h,  $CL_{50}$  72-h y  $CL_{50}$  96-h) con sus correspondientes intervalos de confianza calculados aplicando el método PROBIT se pueden observar, así como la  $CL_{50}$  96-h predicha por el BLM para *P. promelas* en agua del Arroyo Morales, en la Tabla 9. La  $CL_{50}$  en agua del Arroyo Morales disminuyó entre las 24 horas y las 72 horas para mantenerse constante hasta las 96 horas. La  $CL_{50}$  96-h predicha por el BLM fue de dos ordenes de magnitud mayor respecto al valor calculado, por lo tanto, la predicción no fue precisa ya que se encontró fuera del rango de más/menos un factor de 2 respecto de la concordancia perfecta entre la  $CL_{50}$  calculada a partir del ensayo y la predicha por el modelo (Figura 11). En las condiciones en las que se desarrolló el ensayo, el BLM sobrestimó la toxicidad.

En la Figura 13 puede observarse la especiación predicha por el BLM para cada concentración inicial de cobre medida. En todos los casos, la fracción de cobre asociada a materia orgánica (Cu-MO) fue la más abundante. La segunda especie en abundancia fue el  $CuCO_3$ , cuyo porcentaje fue aumentando al incrementarse la concentración inicial

de cobre en solución, así como la contribución de las especies restantes, entre las cuales el  $\text{Cu}(\text{CO}_3)_2$  fue el más abundante.



**Figura 13.** Especiación del cobre, predicha por el BLM, para cada una de las concentraciones de cobre medidas y el grupo control en agua del Arroyo Morales. Las especies de cobre se encuentran expresadas como porcentajes de la concentración total inicial de cobre en solución.

A modo comparativo también se aplicó el BLM a los parámetros físico-químicos del agua del ensayo realizado por Villar et al. (2000) con agua sintética de baja fuerza iónica (Dureza: 67,66 mg/L  $\text{CaCO}_3$ ) con el objeto de obtener un valor de  $\text{CL}_{50\ 96\text{-h}}$  en un agua más blanda que las experimentadas en esta tesis. Estos autores reportaron para adultos de la especie una  $\text{CL}_{50\ 96\text{-h}}$  de 0,16 (0,24-0,12). Como puede observarse en la Figura 11, el valor de  $\text{CL}_{50}$  predicho por el BLM resultó preciso con respecto al obtenido por Villar et al. (2000) para *C. decemmaculatus*.

#### 4. Discusión

El agua del Río Pilcomayo presenta una elevada dureza. La dureza está dada principalmente por la concentración de calcio y de magnesio (APHA, AWWA, WPCF, 1992). Se ha informado que la toxicidad del cobre en varias especies acuáticas se encuentra correlacionada negativamente con la dureza, sin embargo, otros autores han indicado que no existe efecto alguno de la dureza sobre la toxicidad ó que éste es pequeño (Erickson et al., 1996). El efecto de la dureza sobre la toxicidad del cobre

reflejaría la competencia entre el calcio, el magnesio y el cobre por los sitios de unión en la superficie branquial de los peces. El calcio tendría un efecto protector mayor que el magnesio en la toxicidad del cobre en peces (Van Genderen et al., 2007). El calcio se une a la superficie branquial y controla la permeabilidad de la membrana y la integridad de la función ionoregulatoria (Hunn, 1985). La  $CL_{50}$  calculada en agua del Río Pilcomayo fue superior a la calculada en agua del Arroyo Morales y ésta, a su vez, fue superior a la informada por Villar et al. (2000). Para determinar la influencia de la dureza en los valores obtenidos, se normalizó la toxicidad aguda del cobre medida en el agua del Río Pilcomayo, en el agua del Arroyo Morales y en el trabajo de Villar et al. (2000) a un valor de dureza de 50 mg/L  $CaCO_3$  aplicando la fórmula de conversión de la US EPA (1985) para la normalización de datos, provista en los criterios de calidad de agua para el cobre ( $CL_{50}$  a 50 mg/L =  $e^{\ln(CL_{50})-0.9422*(\ln(dureza)-\ln(50))}$ ). La normalización de la  $CL_{50}$  obtenida en agua del Río Pilcomayo dió un valor de 0,12 mg/L (0,08-0,15), y para el valor estimado por Villar et al. (2000) la  $CL_{50}$  normalizada fue de 0,12 mg/L (0,09-0,18). Por otra parte, la normalización de la  $CL_{50}$  obtenida en agua del Arroyo Morales fue de 0,06 mg/L (0,03-0,14). Estos resultados indican que la dureza aparentemente fue el factor más importante en la determinación de la toxicidad del cobre en agua del Río Pilcomayo y en el ensayo de Villar et al. (2000). En agua del Arroyo Morales, en cambio, es posible que exista otro factor que influya en el aumento de la toxicidad. Algunos estudios han sugerido que la proporción molar entre el calcio y el magnesio sería más importante que sus concentraciones absolutas. La proporción entre el calcio y el magnesio (Ca:Mg) en el agua del Río Pilcomayo en el momento del ensayo fue de 1,45. En el agua del Arroyo Morales esta proporción fue de 0,89. Estudios previos han informado que la dureza consistente principalmente de calcio (proporciones Ca:Mg >1) tiene un efecto protector tanto en peces (Carvahalo y Fernández, 2006; Erickson et al., 1996) como en invertebrados (Van Genderen et al., 2007). En cambio, la dureza consistente principalmente de magnesio (Ca:Mg proporción molar  $\leq 1$ ) tiene un efecto protector importante únicamente en invertebrados (Markich et al., 2006). La proporción Ca:Mg <1 en agua del Arroyo Morales podría explicar, en parte, el menor valor de  $CL_{50}$  con respecto al valor obtenido en agua del Río Pilcomayo.



La alcalinidad, por su parte, afecta la especiación del cobre en solución a través de la complejación con carbonatos, lo que modifica su biodisponibilidad (Markich et al., 2006). El efecto de la dureza en la toxicidad por metales sobre la biota acuática, se encuentra, en algunos casos mal interpretado por correlaciones con la alcalinidad, el pH y/u otros iones presentes. Van Genderen et al. (2007) han informado que la relación entre la alcalinidad y los valores de  $CL_{50}$  para *P. promelas* no era significativa en las aguas naturales de su estudio, pero el análisis en el laboratorio de los parámetros de calidad de agua demostraron una correlación positiva significativa. Lauren y MacDonald (1985), asimismo, concluyeron que el ion cúprico y los hidroxio complejos de cobre eran tóxicos, pero no los complejos carbonatados de cobre. Cuando la alcalinidad aumenta, manteniendo el pH constante, la toxicidad del cobre decrece, sin embargo, la magnitud de este efecto varía con la dureza y otras condiciones experimentales e incluso a veces no se observa (Erickson et al., 1996), como fue el caso del ensayo en agua del Arroyo Morales, que presentaba elevadísima alcalinidad y, aún así, se observó una mayor toxicidad del cobre respecto a los ensayos con agua del Río Pilcomayo y a la estimada por el BLM.

La solubilidad del cobre disminuye con el pH hasta alcanzar un mínimo entre 10 y 11 (Stumm y Morgan, 1970). En los ensayos de la presente contribución, el pH medio fue similar y superior a 8. Por lo tanto, el pH no tendría influencia en los valores de toxicidad obtenidos en ambos tipos de agua.

Las elevadas concentraciones de sodio y cloruros en el agua del Río Pilcomayo y la elevada concentración de sodio en el agua del Arroyo Morales podrían tener cierto efecto protector en la toxicidad del cobre. En este sentido, Erickson et al. (1996) observaron que la adición de cloruro de potasio incrementó la toxicidad del cobre, mientras que la adición de cloruro de calcio y de cloruro de sodio la redujo. La adición de cloruro de magnesio no tuvo efecto alguno. Cuando el calcio, el sodio y el magnesio fueron agregados como sales de sulfato, se observó el mismo efecto. El cloruro también podría tener un efecto sobre la especiación del cobre. Sin embargo, según la especiación predicha por el BLM, la contribución de los cloruros y los sulfatos fue mínima.

Otros parámetros de calidad de agua que son considerados por su capacidad de disminuir la toxicidad del cobre por una reducción en su biodisponibilidad son los

ligandos acomplejantes (materia orgánica disuelta, hidróxido y carbonatos). Tanto en agua del Río Pilcomayo como en agua del Arroyo Morales, el efecto de la materia orgánica disuelta (medida como carbono orgánico disuelto) fue evidente. En agua del Río Pilcomayo, la especiación indicó que en todos los tratamientos con excepción de aquellos con las concentraciones de cobre más elevadas, más del 50 % del cobre se encontró asociado a materia orgánica. En agua del Arroyo Morales, más del 50 % del cobre se encontró asociado a materia orgánica en todos los tratamientos, siendo superior al 80 % en todas las concentraciones de cobre excepto en la más elevada. El cobre tiene una gran afinidad por la materia orgánica siendo superior a la del cinc (Bringolf et al., 2006) y el cadmio (Hollis et al., 1997). Varios autores han reportado el efecto protector de la materia orgánica sobre la toxicidad del cobre (entre los más recientes McGeer et al., 2002; Matsuo et al., 2004). Bryan et al. (2002) observaron una mayor complejación del cobre por la materia orgánica disuelta a bajas concentraciones de cobre total. También observaron que en ausencia de materia orgánica disuelta y a un pH de 8,5 la complejación por especies carbonadas es considerable. De acuerdo con Matsuo et al. (2004), el cobre forma complejos con la materia orgánica disuelta, lo que reduce la forma iónica libre en el agua y, por lo tanto, la cantidad de forma iónica libre disponible para unirse a los sitios de la branquia. Estos autores concluyeron que la materia orgánica disuelta tiene un efecto directo en las branquias debido a que compleja cobre e influye en el transporte y permeabilidad de las branquias. Por otra parte, Tao et al. (2000) han propuesto que los compuestos orgánicos con metales adsorbidos podrían adherirse al mucus de la superficie epitelial durante la respiración del pez y que luego, la disociación del complejo liberaría el ion libre, el que podría ser internalizado en el tejido branquial. Erickson et al. (1996), a su vez, han sugerido que cerca del 20 % del cobre asociado a materia orgánica se encontraría disponible para ejercer toxicidad. En el ensayo en agua del Arroyo Morales la concentración de materia orgánica disuelta fue superior a la del agua del Río Pilcomayo y la especiación indicó una mayor proporción de cobre complejado con la materia orgánica respecto del cobre en agua del Río Pilcomayo, esto podría explicar, en parte, la mayor toxicidad observada en agua del Arroyo Morales.

Sólo unos pocos estudios han examinado el efecto de los sólidos en suspensión sobre la toxicidad del cobre. Los resultados obtenidos por Erickson et al. (1996)

sugieren que el cobre adsorbido a los sólidos en suspensión no puede ser considerado estrictamente no tóxico. Tao et al. (1999) han propuesto un mecanismo por el que los peces absorberían metal particulado, mediante la desorción del metal dentro del microambiente de las branquias donde las partículas se adhieren al mucus. Natale et al. (2007) reportaron una mayor toxicidad del cobre en *D. magna* cuando los ensayos de toxicidad eran llevados a cabo con agua del Río Pilcomayo sin filtrar comparados con los ensayos realizados con agua filtrada del mismo río. Estos autores hallaron una interferencia por la presencia de sólidos en suspensión y atribuyeron la diferencia en la toxicidad a la presencia misma de los sólidos y/o a la biodisponibilidad de tóxicos, es decir, cobre y otros metales, adsorbidos a las partículas. Para evitar la interferencia que pudieran ejercer los sólidos en suspensión y con el propósito de comparar los resultados del ensayo con la correspondiente predicción del BLM (que considera que el metal adsorbido al material particulado no ejerce toxicidad) el agua con la que se llevó a cabo el ensayo fue centrifugada y filtrada. Consecuentemente, la aproximación metodológica empleada en este estudio no pudo proveer evidencia del efecto de los sólidos totales en suspensión sobre la toxicidad del cobre. Si el cobre adsorbido a los sólidos en suspensión no es tóxico para los peces, la toxicidad medida en base al cobre disuelto en ensayos llevados a cabo con agua del Río Pilcomayo sin filtrar, no debería diferir de los resultados del presente ensayo.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la toxicidad del cobre predicha por el BLM para *P. promelas* ha sido precisa con respecto a la toxicidad del cobre en *C. decemmaculatus* tanto en el agua del Río Pilcomayo como en el agua sintética de Villar et al. (2000). En agua del Arroyo Morales, en cambio, el valor de toxicidad predicho por el modelo fue muy superior al calculado. Actualmente, el modelo está limitado al rango de valores de cada variable para el cual ha sido calibrado y, en este sentido, la alcalinidad del Arroyo Morales supera ampliamente el valor de calibración del modelo. El sodio en el Arroyo Morales, por su parte, es levemente superior al valor de calibración del BLM. Por lo tanto, la gran diferencia entre los valores de  $CL_{50\ 96-h}$  calculado para *C. decemmaculatus* y predicho por el BLM para *P. promelas* en agua del Arroyo Morales puede deberse a que el modelo sobrestima el efecto protector de la alcalinidad para valores muy elevados tales como los registrados en el Arroyo Morales.

Cabe destacar que la concentración efectiva media a las 48 horas ( $CE_{50\ 48-h}$ ) del cobre reportada por Natale et al. (2007) para *D. magna* en agua del Río Pilcomayo filtrada fue de 0,11 mg/L. Este valor respecto de la toxicidad aguda del cobre obtenida para *C. decemmaculatus* en la misma agua evidencia la sensibilidad diferencial entre especies, que debe tenerse en cuenta en la generación de normativa ambiental sitio-específica ya que ésta debe contemplar el efecto de los contaminantes, los metales pesados, en este caso, en un rango diverso de especies que habitan el mismo cuerpo de agua.

## Capítulo 2

### Toxicidad aguda del cinc en *C. decemmaculatus* en aguas con características químicas extremas

#### 1. Introducción

La abundancia del cinc en la corteza terrestre es similar a la del cobre, es decir, son constituyentes menores de la corteza. El mineral de cinc que se encuentra más comúnmente es la esfalerita (ZnS).

La mayor parte del cinc introducido en los ambientes acuáticos es eventualmente acumulado en los sólidos. El cinc disuelto usualmente consiste en la forma iónica libre, que constituye la forma más tóxica. La concentración del ion libre disminuye a elevada alcalinidad, pH superior a 7,5 y mayor salinidad (Eisler, 1993).

El cinc es usado principalmente en la producción de aleaciones no corrosivas y en el galvanizado de productos de acero y el hierro. Los productos galvanizados se utilizan ampliamente en la industria automotriz, en la construcción y electrodomésticos. El óxido de cinc se utiliza para formar pigmentos para plásticos y papel. El sulfato de cinc se encuentra en fungicidas y tiene aplicación terapéutica en humanos (Eisler, 1993).

El cinc como micronutriente está presente en todos los organismos, siendo muy elevados los niveles (>4 g/kg peso fresco de partes blandas) en bivalvos, moluscos y crustáceos. Los sitios específicos de acumulación incluyen riñón en moluscos; hepatopáncreas en crustáceos; viseras, gónadas y cerebro en peces; hígado, riñón y huesos en aves y páncreas, hígado, riñón y huesos en mamíferos. Las variaciones inter-específicas en el contenido de cinc son considerables aún entre especies taxonómicamente emparentadas y muchas especies regulan el cinc para mantener los niveles dentro de un rango de concentraciones (Eisler, 1993).

El cinc tiene su principal función en las enzimas que regulan la biosíntesis y tasa catabólica del ADN y ARN. El cinc ejerce un efecto protector en el hígado inhibiendo la peroxidación de lípidos y estabilizando las membranas lisosomales; ayuda en la neurotransmisión en cerebro de peces, aves, reptiles y mamíferos; prolonga la contracción muscular; incrementa la afinidad por el oxígeno de la mioglobina; es necesario para el crecimiento y diferenciación de las fibras musculares; incrementa el peso al nacer y es esencial para la cicatrización de heridas en casi todos los organismos estudiados (Eisler, 1993).

En mamíferos y otros vertebrados superiores es absorbido en el intestino pero en los peces las branquias constituyen una vía adicional importante para su absorción (Hogstrand et al., 1996). A niveles de exposición intermedios, el cinc puede ejercer su efecto tóxico en peces inhibiendo la absorción de calcio (Spry y Wood, 1985). Esta inhibición genera un desbalance en las tasas de absorción y pérdida, conduciendo a una pérdida neta de calcio. El calcio y el cinc competirían por el mismo canal apical en las células cloro de las branquias (Verboost et al. 1987, 1989), de forma tal que, así como elevados niveles de cinc inhiben la absorción de calcio, lo inverso también es verdadero. En menor medida, el cinc también afecta los flujos de sodio y cloruro, conduciendo a una pérdida neta de iones en las branquias. El cinc ejerce una toxicidad mucho menor que la ejercida por el cobre y la plata. Dado que los niveles plasmáticos de calcio representan una fracción de la composición iónica del plasma mucho menor que la del sodio y el cloruro, la pérdida de iones calcio resultante de la exposición al cinc, producen un efecto mucho menor que el estrés osmótico que ocasionan pérdidas de sodio y cloruro durante exposiciones letales a cobre ó plata (Santore et al., 2002).

El BLM formulado para el cinc, propuesto por Santore et al. (2002), fue desarrollado a partir de los datos de toxicidad aguda publicados para *O. mykiss* y *P. promelas*. Luego, fue adaptado a dáfnidos. Asimismo, otros modelos fueron desarrollados para toxicidad aguda y crónica en dáfnidos (Heijerick et al., 2002; De Schamphelaere y Janssen, 2004).

Existe un único trabajo previo en el que se ha evaluado la toxicidad del cinc en *C. decemmaculatus* llevado a cabo por Gómez et al. (1998) en varios tipos de aguas e

informaron para individuos adultos de la especie valores de  $CL_{50\ 96-h}$  en el rango de 0,53 a 29,3 mg Zn/L.

### 1.1 Objetivo

Comprender los efectos de la química del agua sobre la toxicidad del cinc en un pez nativo *C. decemmaculatus*, y evaluar una posible extrapolación inter-específica del Zn-BLM en aguas superficiales con características químicas extremas a ser tomada en cuenta en una ampliación conceptual del modelo BLM.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Ensayo de toxicidad aguda del cinc en *C. decemmaculatus* en agua del Río Pilcomayo

Este ensayo se realizó con agua colectada durante la campaña realizada en el mes de mayo del año 2009. La Tabla 8 del Capítulo 1 de la presente Parte (página 54) muestra los principales parámetros físico-químicos del agua del ensayo. Para definir el intervalo de concentraciones a aplicarse en el ensayo, se realizó un ensayo de toxicidad preliminar en el que se expusieron 10 individuos juveniles aclimatados de *C. decemmaculatus* a tres concentraciones nominales de 0,8; 33 y 60 mg Zn/L en un acuario con 2L de volumen del agua experimental durante 96 h. Posteriormente, se aplicó un diseño experimental que consistió en cinco tratamientos ó concentraciones de cinc más un grupo control sin el agregado del metal. La solución stock utilizada para los distintos tratamientos fue de 100 mg Zn/L y el reactivo de grado analítico utilizado fue  $ZnCl_2$ . El número inicial de peces por acuario fue de 10 y el volumen de agua experimental, 2 L.

### 2.2 Ensayo de toxicidad aguda del cinc en *C. decemmaculatus* en agua del Arroyo Morales

Este ensayo se realizó con agua colectada durante la campaña realizada en el mes de octubre del año 2010. La Tabla 8 del Capítulo 1 de la presente Parte (página 54) muestra los principales parámetros físico-químicos del agua del ensayo. El diseño experimental consistió en cinco tratamientos ó concentraciones de cinc más un grupo

control sin el agregado del metal. Las concentraciones aplicadas se obtuvieron a partir de una solución stock de cinc de 100 mg/L. Se utilizó el reactivo  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  grado analítico. En este ensayo el número inicial de peces por pecera fue de 5 y el volumen de agua experimental, 1,2 L.

### 3. Resultados

De acuerdo con la ecuación propuesta por la SSRH (Parte I, página 33), el nivel guía para cinc disuelto en agua del Río Pilcomayo sería  $\leq 0,15$  mg/L y  $\leq 0,08$  mg/L, en agua del Arroyo Morales, para la fechas de los respectivos muestreos. La concentración de cinc disuelto en el muestreo del Río Pilcomayo fue levemente inferior al nivel guía. En el caso del Arroyo Morales, en cambio, la concentración de cinc fue superior al nivel guía.

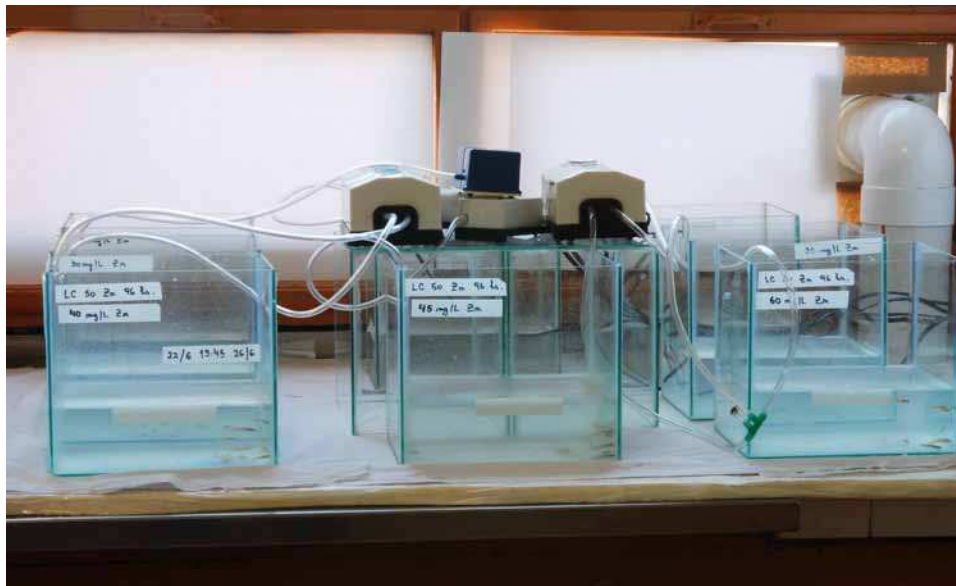
Todas las variables físico-químicas medidas en el agua del Río Pilcomayo en la fecha de muestreo (Capítulo 1, Tabla 8), se encontraron dentro del rango para el cual el BLM puede ser aplicado. En el Arroyo Morales, tanto la alcalinidad como la concentración de sodio superaron el valor límite superior para el que el BLM se encuentra calibrado (Capítulo 1, Tabla 8).

La comparación del caudal medio mensual del mes de mayo del 2009 con los percentiles (P) calculados para los meses de mayo y septiembre del periodo 1961-2008 realizada en la Parte I de esta tesis (página 36), indicó que el caudal medio mensual se ubicó cercano al  $P_{75}$ , es decir, correspondió a un mes de mayo con un caudal medio-alto.

#### *3.1 Ensayo de toxicidad aguda del cinc en C. decemmaculatus en agua del Río Pilcomayo*

Los valores medios de pH y temperatura del ensayo fueron  $7,91 \pm 0,21$  UpH y  $16,6 \pm 1,51$  ° C, respectivamente. Las concentraciones iniciales medidas fueron: 3,74; 9,2; 14; 21,6 y 26,4 mg Zn/L. La longitud estándar media de los individuos seleccionados fue de  $21,1 \pm 2,2$  mm. Una fotografía del ensayo se muestra en la Figura 14.

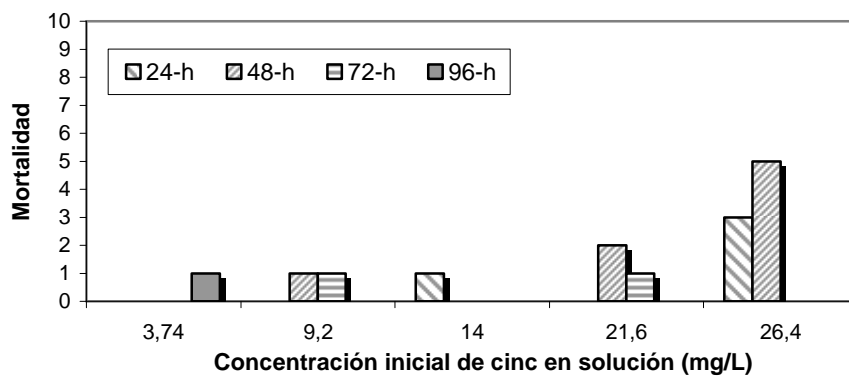




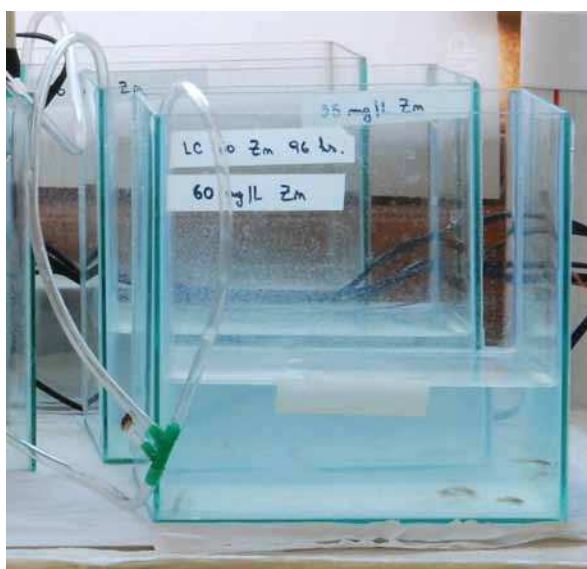
**Figura 14.** Fotografía del ensayo de toxicidad aguda del cinc en agua del Río Pilcomayo.

No se observó mortalidad en el grupo control. El patrón de mortalidad observado se muestra en la Figura 15. En el tratamiento de mayor concentración cinc, la mortalidad ocurrió dentro de las primeras 48 horas de iniciado el ensayo (Figura 15). En los tratamientos de 9,2 y 21,6 mg Zn/L, la mortalidad se produjo entre las 48 y 72 horas.

En las primeras horas del ensayo, el agua en los acuarios se tornó turbia y blanquecina (metal en suspensión), como puede observarse en la Figura 16, sobre todo en aquellos acuarios donde la concentración de cinc era la más elevada.



**Figura 15.** Mortalidad diaria (número de peces sin vida por día) en función de la concentración inicial de cinc en solución en agua del Río Pilcomayo ( $n=10$ ).



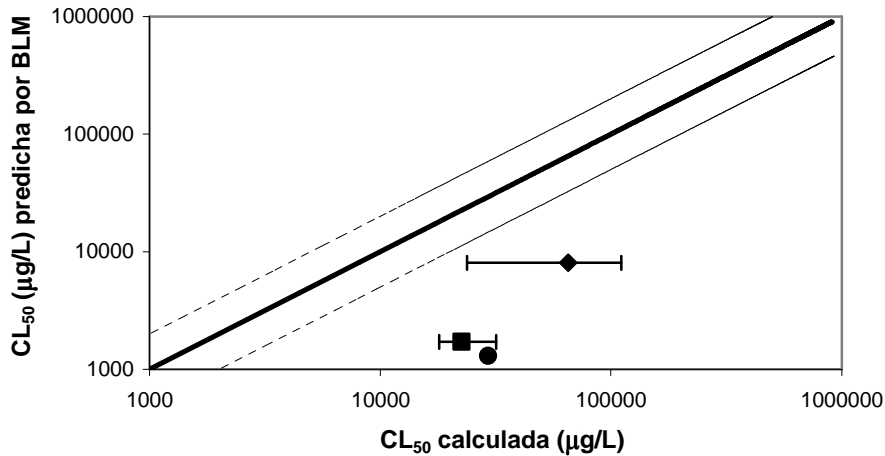
**Figura 16.** Fotografía del ensayo de toxicidad aguda del cinc en agua del Río Pilcomayo. Puede observarse la turbidez blanquecina del agua en la unidad experimental con la mayor concentración de cinc.

La  $CL_{50}$  ( $CL_{50}$ , mg Zn/L) a las 24, 48, 72 y 96 horas ( $CL_{50\ 24-h}$ ,  $CL_{50\ 48-h}$ ,  $CL_{50\ 72-h}$  y  $CL_{50\ 96-h}$ ) con sus respectivos intervalos de confianza calculadas para *C. decemmaculatus* a partir las concentraciones de cinc iniciales medidas y el método PROBIT pueden observarse, así como la  $CL_{50\ 96-h}$  predicha por el BLM para *P. promelas* en el agua experimental, en la Tabla 10. El valor de la  $CL_{50}$  disminuyó en el tiempo hasta las 72 horas para mantenerse constante hasta las 96 horas. El valor predicho por el BLM fue de un orden de magnitud menor al calculado para *C. decemmaculatus*.

**Tabla 10.** Concentración letal media de cinc ( $CL_{50}$ , en mg Zn/L) calculada a las 24, 48, 72 y 96-h para *C. decemmaculatus* en agua del Río Pilcomayo y del Arroyo Morales y valor predicho por el BLM ( $CL_{50\ 96-h}$ ) para *P. promelas* en ambos tipos de agua.

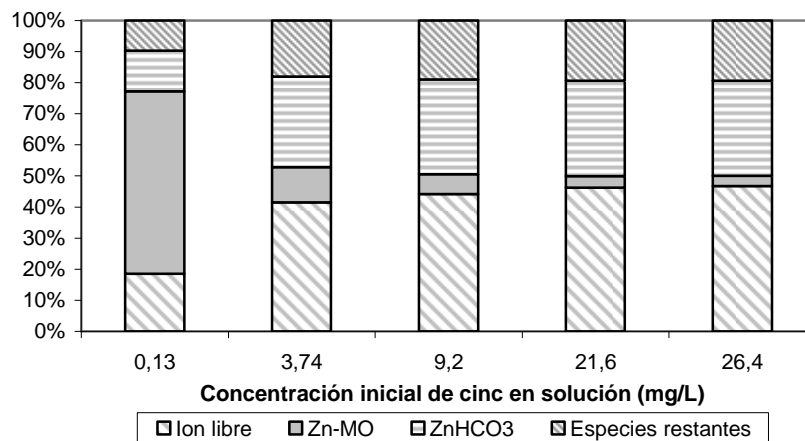
	$CL_{50}$ (mg Zn/L)				
	24-h	48-h	72-h	96-h	BLM
Río Pilcomayo	37,2 (26,6-47,8)	23,6 (19,4-27,5)	22,3 (16,8-43,8)	22,6 (17,5-27,6)	1,71
Arroyo Morales	68,5 (48,8-95,8)	68,5 (48,8-95,8)	65,1 (23,8-111,09)	65,1 (23,8-111,09)	8,06

En la Figura 17 se muestra la  $CL_{50-96 h}$  predicha por el BLM para *P. promelas* en función del mismo parámetro calculado para *C. decemmaculatus*. Como puede observarse, el valor de  $CL_{50}$  predicho por el BLM para *P. promelas* en el agua experimental se encontró fuera del rango de más menos dos respecto de la concordancia perfecta.



**Figura 17.** Toxicidad del cinc ( $CL_{50}$ , en  $\mu\text{g Zn/L}$ ) calculada para *C. decemmaculatus* por Gómez et al. (1998) (●) y en la presente contribución en agua del Río Pilcomayo (■) y en agua del Arroyo Morales (◆) comparadas con la toxicidad del cinc predicha por el BLM para *P. promelas* en los tres tipos de agua. La línea gruesa representa una relación 1:1. Las líneas discontinuas representan predicciones dentro del factor  $\pm 2$ . Las barras de error representan los intervalos de confianza del 95 %.

En la Figura 18 puede observarse la especiación predicha por el BLM para cada concentración inicial de cinc medida del ensayo. En el control (primera columna) el cinc se encontraba mayormente asociado a materia orgánica (Zn-MO) (58,6 %). A mayor concentración de cinc, dicha fracción fue disminuyendo hasta quedar reducida a 3,24 % en el tratamiento de mayor concentración. La forma iónica libre fue incrementándose hasta alcanzar casi el 50 % en el tratamiento de mayor concentración. El cinc como  $\text{ZnHCO}_3$  y las especies restantes totalizaron el 50 %. Entre las especies restantes el  $\text{ZnCO}_3$  fue la especie más abundante.



**Figura 18.** Especiación del cinc, predicha por el BLM, para cada una de las concentraciones medidas y el grupo control en agua del Río Pilcomayo. Las especies de cinc se encuentran expresadas como porcentajes de la concentración total inicial de cinc en solución.

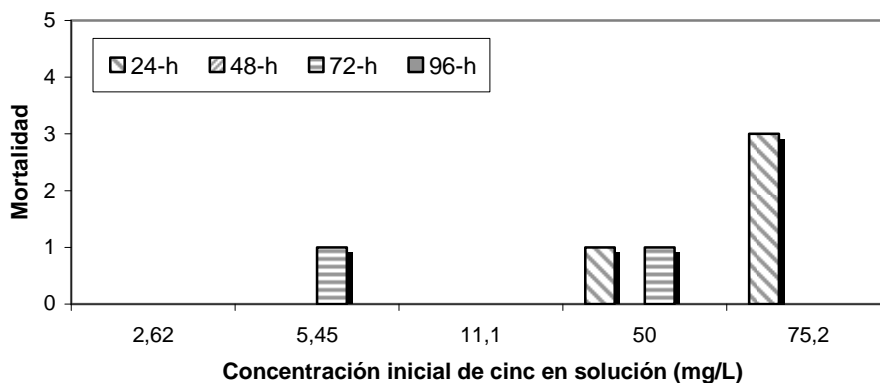
### 3.2 Ensayo de toxicidad aguda del cinc en *C. decemmaculatus* en agua del Arroyo Morales

Los valores medios de temperatura y pH del ensayo fueron de  $22,5 \pm 1,06$  °C y  $8,83 \pm 0,41$  UpH, respectivamente. Las concentraciones iniciales de cinc medidas fueron: 2,62; 5,45; 11,1; 50 y 75,2 mg Zn/L. La longitud estándar media de los individuos fue de  $14,4 \pm 1,9$  mm.

No se produjo mortalidad en el grupo control. El patrón de mortalidad observado se muestra en la Figura 19. En el tratamiento con la concentración de cinc más elevada, la mayor mortalidad se produjo durante las primeras 24 horas. Al igual que en el ensayo con agua del Río Pilcomayo, durante las primeras horas el agua en los acuarios se tornó notablemente blanquecina y turbia (precipitado de naturaleza coloidal). Cumplidas las primeras 24 horas, se observó un precipitado blanco abundante. Esto ocurrió en aquellos acuarios donde la concentración de cinc era la más elevada.

La concentración letal de la mediana para el cinc ( $CL_{50}$ , mg/L) a las 24, 48, 72 y 96 horas ( $CL_{50\ 24-h}$ ,  $CL_{50\ 48-h}$ ,  $CL_{50\ 72-h}$  y  $CL_{50\ 96-h}$ ) con sus respectivos intervalos de confianza, calculadas aplicando el método PROBIT a las concentraciones iniciales medidas así como la  $CL_{50\ 96-h}$  predicha por el BLM para *P. promelas* en el agua experimental se muestran en la Tabla 10. La  $CL_{50}$  se mantuvo constante entre las 24 y 48 horas y luego disminuyó para mantenerse constante entre las 72 y 96 horas. Como

puede observarse, la  $CL_{50\ 96-h}$  predicha por el BLM para *P. promelas* fue de dos órdenes de magnitud menor al valor calculado para *C. decemmaculatus*.



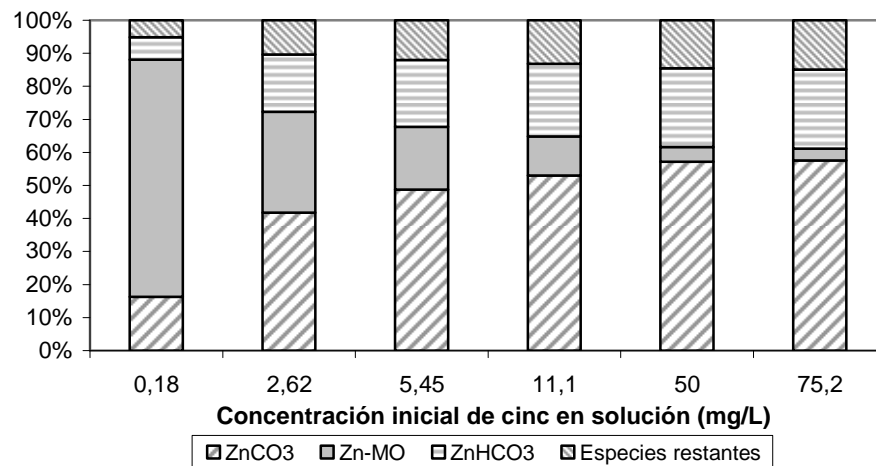
**Figura 19.** Mortalidad diaria (número de peces sin vida por día) en función de la concentración inicial de cinc en solución en agua del Arroyo Morales ( $n=5$ )

En la Figura 17 se muestra la  $CL_{50-96\ h}$  predicha por el BLM para *P. promelas* en función del mismo parámetro calculado para *C. decemmaculatus*. La  $CL_{50}$  predicha por el BLM no fue precisa ya que no se ubicó dentro del rango de más/menos un factor de 2 respecto de la concordancia perfecta entre la  $CL_{50}$  calculada a partir del ensayo y la predicha por el modelo.

El BLM se aplicó también a los parámetros físico-químicos del agua del ensayo realizado por Gómez et al. (1998) en agua del estuario del Río de la Plata, con una dureza de 103 mg/L  $CaCO_3$ , un pH de 7,9 y una alcalinidad de 217 mg/L  $CaCO_3$ . Dado que los autores no informaron valores de materia orgánica disuelta, el modelo se aplicó con un valor de carbono orgánico disuelto de 4,38 mg C/L, calculado a partir de un valor de demanda química de oxígeno (DQO) de 11,7 y un factor de 2,67 (AGOSBA-OSN-SIHN, 1992). El valor de  $CL_{50\ 96-h}$  informado por Gómez et al. (1998) para adultos de *C. decemmaculatus* es de 29,35 mg Zn/L. El valor predicho por el BLM fue de 1,3 mg Zn/L. Como puede observarse en la Figura 17, el valor de  $CL_{50}$  predicho por el BLM no fue preciso con respecto al obtenido por Gómez et al. (1998).

La especiación predicha por el BLM para cada concentración inicial del ensayo (Figura 20) muestra que, así como para la especiación predicha por el BLM en agua del Río Pilcomayo, en el control (primera columna) el cinc se encontraba en un 71%

asociado a materia orgánica (Zn-MO). Luego, dicha fracción se redujo ampliamente con el aumento de la concentración de cinc hasta quedar reducida a 3,5 % en el tratamiento de mayor concentración. Concomitantemente, fueron incrementándose las especies de cinc carbonatadas ( $\text{ZnCO}_3$  y  $\text{ZnHCO}_3$ ). Entre las especies restantes, la mayor contribución fue del  $\text{Zn(OH)}_2$ .



**Figura 20.** Especiación del cinc, predicha por el BLM, para cada una de las concentraciones de cinc medidas y el grupo control en agua del Arroyo Morales. Las especies de cinc se encuentran expresadas como porcentajes de la concentración total inicial de cinc en solución.

#### 4. Discusión

En el contexto del marco conceptual del BLM, los efectos competitivos entre los cationes de la dureza (calcio, magnesio) y el cinc en el ligando biótico explicarían la disminución de la toxicidad del cinc con el aumento de la dureza del agua. Dado que el cinc y el calcio comparten la misma entrada apical, un mayor efecto protector es esperado por elevadas concentraciones de calcio. El agua del Río Pilcomayo está caracterizada particularmente por su elevada concentración de calcio y magnesio, lo cual resulta en un agua con elevada dureza. El valor de  $CL_{50\ 96-h}$  informado por Gómez et al. (1998) para *C. decemmaculatus* en agua del estuario del Río de la Plata, agua con una dureza de 103 mg/L  $\text{CaCO}_3$  fue de 29,35 mg/L. Aún cuando la dureza del agua del Pilcomayo triplicó la del Río de la Plata, el valor de toxicidad reportado por Gómez et al. (1998) fue superior a la  $CL_{50}$  calculada en agua del Río Pilcomayo, es decir, la

toxicidad del cinc fue menor en el agua más blanda. Por otro lado, el valor de  $CL_{50}$  en el agua del Arroyo Morales fue muy superior al de ambos ensayos y su dureza era intermedia (178 mg/L  $CaCO_3$ ). De acuerdo a lo reportado en la bibliografía, la dureza sería un importante factor protector frente a la toxicidad del cinc en peces. En este sentido, Bradley y Sprague (1985) han reportado que la dureza del agua ejerce sobre la toxicidad del cinc en trucha arco iris una acción protectora mayor que la elevada alcalinidad. Everall et al. (1989), por su parte, observaron un efecto protector de agua dura sobre la toxicidad del cinc en trucha marrón (*Salmo trutta*) dentro del rango de pH de 4-6 y 8-9. En agua con una dureza total de 204 mg/L  $CaCO_3$  estos autores reportaron valores de  $CL_{50\ 96-h}$  desde 2,69 a 3,20 mg/L, y en agua blanda, los valores informados fueron en el rango de 1,07 a 2,31 mg/L. Asimismo, Judy y Davies (1979) informaron una disminución significativa de la toxicidad del cinc en *P. promelas* con el agregado de calcio al agua del ensayo. Dado que la toxicidad observada en los dos ensayos de la presente contribución y en el ensayo de Gómez et al. (1998), no se relacionó con el valor de la dureza de las aguas estudiadas, es posible que a elevadas concentraciones de cinc, como las evaluadas en los tres ensayos, la dureza del agua no ejerce un efecto proporcional a su concentración en la reducción de la toxicidad del cinc en *C. decemmaculatus*.

El magnesio, por otra parte, se cree que ejerce un efecto protector menor frente a la toxicidad de los metales en peces, al igual que el sodio. Sin embargo, cabe destacar que la concentración de sodio en el agua del Arroyo Morales era de 10,8 mM. Heijerick et al. (2005) reportaron en *D. magna* un efecto competitivo débil entre el sodio y el cinc por la unión al ligando biótico. Por otro lado, Clifford y McGeer (2009) observaron una pequeña disminución en la toxicidad aguda del cinc en *Daphnia pulex* a concentraciones de sodio de entre 1 y 1,5 mM. Si bien se considera que el sodio tiene un efecto protector sólo en invertebrados, es posible que niveles de sodio elevados como los presentes en el Arroyo Morales, ejerzan un cierto efecto protector, lo cual pudo influir en el elevado valor de la  $CL_{50\ 96-h}$  obtenido para *C. decemmaculatus* en el agua del arroyo.

El Río Pilcomayo también se caracteriza por su elevada concentración de cloruros, sodio y sulfatos. El Arroyo Morales presenta, por su parte, una altísima alcalinidad. Tanto los cloruros, sulfatos y la alcalinidad se espera que reduzcan la

biodisponibilidad del metal a través de la complejación. Según la especiación del cinc predicha por el BLM en agua del Río Pilcomayo, la complejación de cinc por cloruros y sulfatos fue muy baja. Por lo tanto, las elevadas concentraciones de sulfatos y cloruros en esta agua parecen no ejercer un efecto importante en la reducción de la biodisponibilidad a través de la complejación. Por otra parte, la elevada alcalinidad del Arroyo Morales ejerció un fuerte efecto en la especiación, complejando más del 50% del cinc en todas las concentraciones de cinc medidas, llegando al 80 % en la concentración más alta.

De acuerdo con Solbe (1973) la solubilidad del cinc en aguas superficiales esta esencialmente controlada por la solubilidad del carbonato de cinc, lo cual, a su vez, es función de la concentración del ion carbonato. En el Río Pilcomayo la dureza es superior a la alcalinidad. Cuando la relación entre estos dos parámetros es de este tipo, el calcio y el magnesio, además de encontrarse como sales de carbonato y bicarbonato, están presentes como sulfato y cloruros, o sea con los otros aniones mayoritarios. En cambio cuando la alcalinidad supera la dureza, y en el Arroyo Morales la supera ampliamente, existen, además de sales de calcio y magnesio como carbonato y bicarbonato, sales de sodio y potasio como carbonato y bicarbonato, es decir, con los otros cationes mayoritarios (Conzonno, 2009), entre los cuales, en los ensayos se encontraba el cinc. Esto coincide con la especiación predicha por el BLM para las concentraciones de cinc medidas en agua del Arroyo Morales, ya que el porcentaje de  $ZnCO_3$  fue incrementándose con la concentración de cinc en solución.

Se ha reportado que la materia orgánica disuelta disminuye la cantidad de metal biodisponible. Según la especiación predicha por el BLM, la materia orgánica disuelta tuvo un importante efecto protector a bajas concentraciones de cinc en ambos tipos de agua y especialmente en el Arroyo Morales. La menor toxicidad del cinc observada en esta agua con respecto de la toxicidad en agua del Río Pilcomayo, podría deberse a la menor biodisponibilidad del metal por la acción complejante de la materia orgánica. En este sentido, De Schamphelaere et al. (2005) observaron que la concentración de materia orgánica en solución sería un importante predictor de la toxicidad crónica y aguda del cinc en el alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata*, en *D. magna* y trucha arcoiris. Sin embargo, Bringolf et al. (2006) reportaron que por lo menos 11 mg C/L



fueron necesarios para manifestar un efecto protector frente a la toxicidad del cinc en larvas de *P. promelas*.

Dado que el agua del Río Pilcomayo presenta una elevada concentración de sólidos en suspensión, la concentración de cinc total en el agua de este río fue superior a la concentración disuelta. Esto refleja que en el río gran parte del metal se encuentra adsorbido a las partículas en suspensión, por lo tanto, los sólidos en suspensión ejercerían un importante efecto reduciendo la biodisponibilidad del cinc en esta agua.

La toxicidad aguda del cinc en *C. decemmaculatus* claramente difirió de la predicción del BLM para *P. promelas* en ambos tipos de agua. Comparados con otras especies, los valores de  $CL_{50}$  obtenidos para *C. decemmaculatus* resultan elevados. Mount (1966) reportó valores de  $CL_{50}$  menores de 10 mg/L para *P. promelas* en aguas con valores de  $pH > 7,5$  y Everall et al. (1989) obtuvieron una  $CL_{50}$  de 0,64 (0,52-0,78) mg/L a  $pH$  7 y de 1,00 (0,83-1,20) mg/L a  $pH$  8 para trucha marrón en agua dura. En estos dos trabajos el agua del ensayo se tornó blanquecina y el BLM subestimó la toxicidad del cinc. Estos autores atribuyen esta discrepancia a una posible toxicidad del precipitado que permaneció en suspensión. Varios estudios indican que el cinc precipitado sería más tóxico para los peces que las formas solubles; otros sugieren lo opuesto. De acuerdo con Everall et al. (1989), el cinc precipitado puede ser atrapado por el mucus y las láminas epiteliales de las branquias. Sumado al daño directo al tejido branquial, este proceso podría llevar a la acumulación local del metal en la superficie branquial. El menor  $pH$  en el microambiente de las branquias podría facilitar la liberación del cinc de los precipitados. Aún así, en los ensayos de la presente contribución, el cinc precipitado parece no haber producido una toxicidad diferencial.

En agua del Río Pilcomayo, el  $pH$  medio del ensayo fue de 7,91 y en agua del Arroyo Morales el  $pH$  fue de 8,83. Santore et al. (2002) mostraron que la solubilidad del cinc disminuye con el aumento del  $pH$  hasta alcanzar un mínimo a un  $pH$  de aproximadamente 8,5; donde la solubilidad comienza a incrementarse por formación de especies solubles. En ambos ensayos, el elevado valor del  $pH$  produjo la precipitación del cinc, que pudo efectivamente observarse. Sin embargo en los primeros momentos del ensayo los peces estuvieron en contacto con las concentraciones disueltas de cinc que fueron medidas De acuerdo con lo expuesto por Santore et al. (2001), si la

diferencia entre las aguas experimentales se debiera únicamente al pH, la fracción de cinc en solución sería prácticamente la misma entre ensayos, sin embargo, las especiación predicha por el BLM para el ensayo en agua del Río Pilcomayo indicó la presencia de cinc en su forma iónica libre, alcanzando un 40 % en casi todos los tratamientos. En agua del Arroyo Morales, en cambio, la especiación indicó que el cinc se encontró fundamentalmente asociado a carbonatos y bicarbonatos. Es decir, la elevada alcalinidad en el Arroyo Morales redujo la biodisponibilidad del cinc. Esta diferencia en la especiación del cinc entre ensayos podría explicar la mayor toxicidad del cinc observada para *C. decemmaculatus* en agua del Río Pilcomayo.

Los valores de  $CL_{50}$  obtenidos en la presente contribución, tanto en agua del Río Pilcomayo como en agua del Arroyo Morales, y por Gómez et al. (1998) respecto de la toxicidad predicha por el BLM para *P. promelas* indican que el BLM sobrestimó la toxicidad.

Se ha establecido que existen marcadas diferencias entre varias especies respecto a la sensibilidad al cinc. Se sabe que los salmónidos son más sensibles al cinc que los no-salmónidos (Gül et al., 2009). Svecevičius (1999) reportó para trucha arco iris, espinoso (*Gasterosteus aculeatus*), rutilo (*Rutilus rutilus*), perca (*Perca fluviatilis*) y carpa común (*Leuciscus leuciscus*) en agua con un pH medio de entre 7,9 – 8,1 y una dureza de entre 270 a 300 mg/L  $CaCO_3$ , valores de  $CL_{50\ 96-h}$  en el rango de 3,79 a 11,37 mg Zn/L. La secuencia de sensibilidad fue: trucha arco iris > espinoso > perca > carpa > rutilo. Ebrahimpour et al. (2010), por su parte, informaron para *Capoeta fusca* en agua con una dureza de 40, 150 y 380 mg/L  $CaCO_3$ , valores de  $CL_{50\ 96-h}$  de 13,7; 74,4 y 102,9 mg Zn/L, respectivamente. Asimismo, Gül et al. (2009) obtuvieron para individuos adultos de *Poecilia reticulata* una  $CL_{50\ 96-h}$  de 30,83 mg Zn/L en agua con una dureza de 230 mg/L  $CaCO_3$ . Por lo tanto, la menor toxicidad del cinc observada para *C. decemmaculatus* en ambos tipos de agua, respecto de las predicción del BLM para *P. promelas* podría estar reflejando que *C. decemmaculatus* sería una especie menos sensible al cinc respecto de *P. promelas*.

## Capítulo 3.

### Toxicidad aguda del cadmio en *C. decemmaculatus* en un agua con características químicas extremas

#### 1. Introducción

El cadmio es comparativamente raro en el ambiente. Típicamente se lo encuentra asociado a minerales de cinc y en algunos casos a minerales de cobre y plomo.

Las formas disueltas de cadmio están presentes únicamente en el estado de valencia +2. El cadmio presenta tendencia a la formación de complejos acuosos con tanto ligandos inorgánicos como orgánicos, sin embargo, la forma iónica libre es bastante estable. Los complejos inorgánicos más importantes que forma el cadmio son con hidróxido, cloruro, sulfato, bicarbonato, carbonato, cianuro y amonio. La complejación del cadmio con ácidos húmicos es importante bajo condiciones de elevada concentración de carbono orgánico disuelto (<http://www.epa.gov/nrmrl/pubs/600r10093/600r10093.pdf>). El cadmio posee una gran afinidad por las cargas negativas en la superficie de las partículas, por lo tanto, tiende a ser removido de solución rápidamente y es acumulado en sedimentos.

Los usos industriales primarios del cadmio son el enchapado metálico, producción de baterías de Ni-Cd, como estabilizante en plásticos y como pigmento (Eisler, 1985).

El cadmio liberado a la atmósfera, a los ambientes acuáticos y los ambientes terrestres proviene de varias fuentes. Los lodos provenientes de las plantas de tratamiento de efluentes, la actividad minera (relaves mineros), fundición de metales (aguas resultantes del proceso), plantas de reciclaje de baterías, y desechos provenientes del enchapado constituyen las principales fuentes de contaminación de cadmio en aguas

subterráneas y superficiales. Otras fuentes incluyen la producción de hierro y acero, la incineración de residuos, la producción de cemento y la escorrentía en campos cultivados, debido a la presencia de cadmio en fertilizantes (Eisler, 1985).

El cadmio no constituye un elemento esencial para la vida de plantas y animales y sus compuestos son muy tóxicos para casi todos los organismos vivos. Concentraciones de cadmio en agua superiores a 10 µg/L están asociadas a elevada mortalidad, reducción del crecimiento, inhibición en la reproducción y otros efectos adversos. Los efectos teratogénicos en animales aparentemente son mayores para el cadmio que para otros metales, incluyendo el plomo, mercurio, cobre y arsénico (Eisler, 1985). El Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos (DHHS) ha determinado que el cadmio y los compuestos de cadmio son carcinogénicos en seres humanos ([http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es\\_tfacts60.html](http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts60.html)).

En peces, el cadmio aparentemente es absorbido en las branquias, al menos en parte, vía transporte de calcio. Más específicamente, el cadmio entra a las células cloro situadas en las branquias por canales apicales de calcio y, potencialmente, inhibe su capacidad transportadora por inhibición competitiva de la Ca-ATPasa de alta afinidad situada en la membrana basolateral. Esto tiene como consecuencia el cierre de los canales de calcio apicales debido a que es bloqueada la salida de calcio hacia el torrente sanguíneo y los niveles intracelulares de calcio se elevan (Verbost et al., 1987, 1989; Reid y McDonald, 1988; Wicklund-Glynn et al., 1994; Wong y Wong, 2000 en Baldisserotto et al., 2004). Esta severa interrupción de la homeostasis en peces expuestos a cadmio, eventualmente, conduce a la muerte del pez (Nigoyi et al., 2008).

En la bibliografía aparece un trabajo realizado por de la Torre et al. (1997) en el que estudiaron la toxicidad aguda del cadmio en *C. decemmaculatus* en el agua del Río Reconquista, que recibe efluentes de tipo industrial y doméstico. Los autores informaron que la toxicidad del cadmio estaba determinada por la composición química del agua que presentó una variación temporal de acuerdo con los pulsos de contaminación.

### 1.1 Objetivo

Comprender los efectos de la química del agua sobre la toxicidad del cadmio en un pez nativo *C. decemmaculatus*, y evaluar una posible extrapolación inter-específica del Cd-BLM en aguas superficiales con características químicas extremas a ser tenida en cuenta en una ampliación conceptual del modelo BLM.

## 2. Materiales y métodos

Este ensayo se realizó con agua colectada durante la campaña realizada en el mes de mayo del año 2010 en Misión La Paz, Salta (Parte I, Figura 3). Para definir el intervalo de concentraciones a aplicarse en el ensayo, se realizó un ensayo de toxicidad preliminar en el que se expusieron 4 individuos juveniles aclimatados de *C. decemmaculatus* a una concentración nominal de 1 mg Cd/L en un acuario con 2L de volumen del agua experimental durante 96 h. Posteriormente se aplicó un diseño experimental que consistió en cuatro tratamientos ó concentraciones de cadmio más un grupo control sin el agregado del metal. La solución stock utilizada para las distintas concentraciones ensayadas fue de 100 mg Cd/L y el reactivo de grado analítico utilizado fue CdCl<sub>2</sub>. El volumen de agua experimental en cada acuario fue de 2 litros y se colocaron 10 peces por acuario.

## 3. Resultados

Los principales parámetros físico-químicos del agua colectada en el Río Pilcomayo se pueden observar en la Tabla 11. Todos los valores se encontraron dentro del rango para el cual el BLM ha sido calibrado.

De acuerdo con la ecuación propuesta por la SSRH (Parte I, página 33), el nivel guía para el cadmio en agua del Río Pilcomayo para la fecha del muestreo sería  $\leq 0,00034$  mg/L. En el muestreo realizado en el Río Pilcomayo, la concentración de cadmio disuelto se encontró por debajo del nivel guía.

La comparación del caudal medio mensual del mes de mayo del 2009 con los percentiles (P) calculados para los meses de mayo y septiembre del periodo 1961-2008

realizada en la Parte I de esta tesis (página 36), indicó que el caudal medio mensual en mayo del 2010 fue cercano al P<sub>25</sub>. Es decir, el caudal fue medio bajo con respecto a los meses de mayo de la serie de tiempo 1961-2008.

El pH y temperatura promedios del ensayo fueron  $7,56 \pm 0,45$  UpH y  $20,4 \pm 0,46$  °C, respectivamente. Las concentraciones iniciales de cadmio medidas en los distintos tratamientos fueron de 1,01; 2,36; 3,3 y 4,2 mg Cd/L. En el grupo control la concentración de cadmio fue inferior al límite de detección y en el mismo no se registró mortalidad. La longitud estándar media de los individuos seleccionados fue de  $18,7 \pm 1,8$  mm. En ningún momento se observó precipitado.

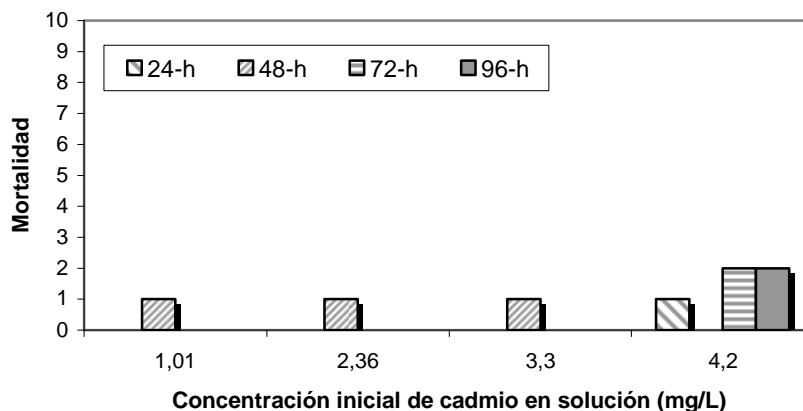
**Tabla 11.** Principales parámetros físico-químicos del agua del Río Pilcomayo. El caudal, temperatura, pH, oxígeno disuelto y conductividad eléctrica corresponden a mediciones *in situ*.

Parámetro	Unidad	Río Pilcomayo
Q	m <sup>3</sup> /s	74,67
T	°C	16,7
pH	UpH	7,31
CE	µS/cm	907
OD	mg/L	-
Ca <sup>2+</sup>	mg/L	59
Mg <sup>2+</sup>	mg/L	27,7
Cl <sup>-</sup>	mg/L	45,25
Na <sup>+</sup>	mg/L	46
K <sup>+</sup>	mg/L	4,52
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	mg/L	231,2
COD	mg/L	5,5
Alc	mg/L CaCO <sub>3</sub>	95
Dureza	mg/L CaCO <sub>3</sub>	261,5
STS	mg/L	1980
STD	mg/L	667,25
Cd T.	mg/L	0,00375
Cd D.	mg/L	ND

La mortalidad observada se muestra en la Figura 21. Como puede observarse, la mortalidad, no mostró un patrón de definido.

La concentración letal de la mediana del cadmio (CL<sub>50</sub>, mg Cd/L) a las 24, 72 y 96 horas (CL<sub>50 24-h</sub>, CL<sub>50 72-h</sub> y CL<sub>50 96-h</sub>) con sus respectivos intervalos de confianza calculada para *C. decemmaculatus* aplicando el método PROBIT a las concentraciones iniciales medidas fueron de: 10,54 (6,04-15,03) mg Cd/L; 7,28 (5,35-9,2) mg Cd/L y

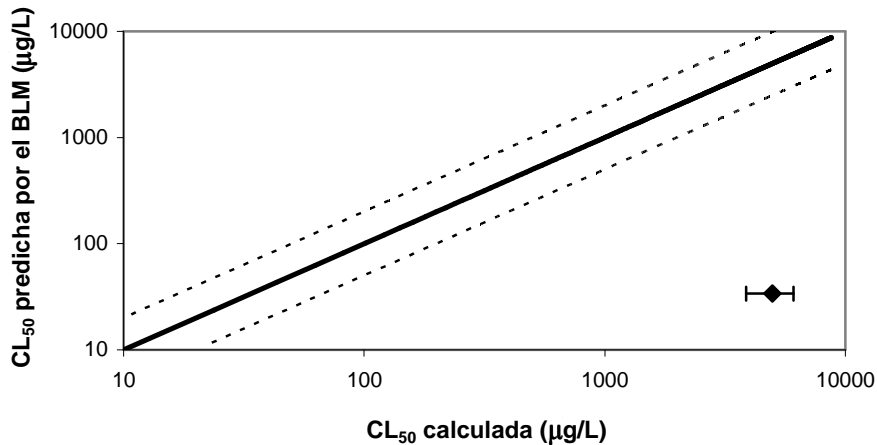
4,98 (3,87-6,09) mg Cd/L, respectivamente. La  $CL_{50\ 96-h}$  predicha por el BLM para *P. promelas* en el agua del ensayo fue de 0,034 mg Cd/L. Este valor fue dos órdenes de magnitud menor al valor calculado experimentalmente.



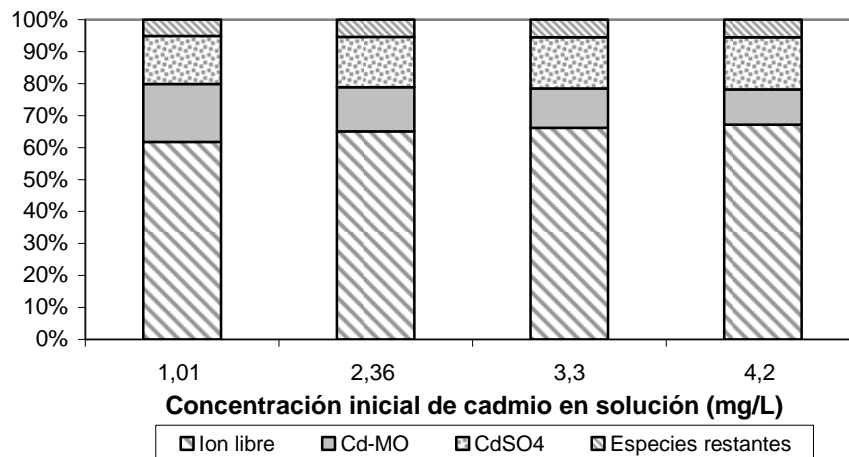
**Figura 21.** Mortalidad diaria (número de peces sin vida por día) en función de la concentración inicial de cadmio en solución en agua del Río Pilcomayo ( $n=10$ ).

En la Figura 22 se muestra la  $CL_{50-96\ h}$  predicha por el BLM para *P. promelas* en función del mismo parámetro calculado para *C. decemmaculatus*. Como puede observarse, la  $CL_{50\ 96-h}$  predicha por el BLM no fue precisa ya que no se encontró dentro del rango de más/menos un factor de 2 respecto de la concordancia perfecta entre  $CL_{50}$  experimental y predicha por el modelo.

De acuerdo con la especiación predicha por el BLM para cada una de las concentraciones de cadmio iniciales medidas (Figura 23), el cadmio se encontró en todas ellas en más de un 60 % en su forma iónica libre incrementándose de 60 a 67 % de menor a mayor concentración de cadmio. El cadmio asociado a materia orgánica en solución (Cd-MO) fue la segunda especie química en abundancia, reduciendo su contribución de 18%, en los ensayos de menor concentración, a 10 % en los de mayor concentración inicial de cadmio en solución. La contribución de  $CdSO_4$  y de las especies restantes fue la misma entre concentraciones.



**Figura 22.** Toxicidad del cadmio ( $CL_{50}$ , en  $\mu\text{g Cd/L}$ ) calculada para *C. decemmaculatus* en agua del Río Pilcomayo (♦) comparada con la toxicidad del cadmio predicha por el BLM para *P. promelas* en la misma agua. La línea continua representa una relación 1:1. Las líneas discontinuas representan predicciones dentro del factor  $\pm 2$ . Las barras de error representan los intervalos de confianza del 95 %.



**Figura 23.** Especiación del cadmio, predicha por el BLM, para cada una de las concentraciones de cadmio medidas en agua del Río Pilcomayo. Dado que en el grupo control la concentración de cadmio fue no detectable, no se muestra la especiación. Las especies de plata se encuentran expresadas como porcentajes de la concentración total inicial de cadmio en solución.

#### 4. Discusión

La dureza del agua es frecuentemente referida como el factor de mayor influencia en la toxicidad del cadmio. Varios autores han observado una disminución de la toxicidad del cadmio con un aumento en la dureza (Calamari et al., 1980, Brinkman y Hanssen, 2007, Nigoyi et al., 2008). Verbost et al. (1989) han demostrado que la



absorción de cadmio y calcio se encuentran funcionalmente relacionadas ya que comparten los mismos sitios de unión en las branquias e interactúan competitivamente por dichos sitios de entrada. En la presente contribución, la elevada dureza que caracteriza al agua del Río Pilcomayo probablemente ejerció un importante efecto protector a nivel de sitios de entrada en las branquias. Referente al magnesio, estos autores observaron también que la unión del cadmio era independiente tanto del magnesio como del sodio en concentraciones de estos cationes muy similares a las del agua de la presente contribución (magnesio: 26,5 mg/L y sodio: 50,6 mg/L). Por el contrario, en *D. magna*, Clifford y McGeer (2010) observaron un efecto protector del magnesio, aunque menor al ejercido por el calcio. Los autores atribuyen que, si bien el magnesio puede ejercer un efecto competitivo en el sitio de unión de calcio, éste sería menos pronunciado debido a una afinidad relativamente menor con respecto al calcio.

La biodisponibilidad y toxicidad del cadmio son menos afectadas por la materia orgánica disuelta que en otros metales como el cobre (Hollis et al., 1997). Se ha observado que el cadmio se une a ácidos húmicos, fúlvicos y también a grupos funcionales menos abundantes como los tiol y las aminas (Cao et al., 2006; Karlsson et al., 2007). En el agua del Río Pilcomayo, la especiación predicha por el BLM indicó que la fracción de cadmio unida a materia orgánica disuelta fue la segunda en importancia, aunque su contribución disminuyó a mayor concentración de cadmio en solución. Nigoyi et al. (2008) observaron una disminución significativa de la toxicidad del cadmio en trucha arco iris a elevadas concentraciones de materia orgánica disuelta (>10 mg C/L). Clifford y McGeer (2010) observaron una disminución de la toxicidad del cadmio como cadmio total en *D. magna* con un aumento en dos fuentes de materia orgánica de origen natural. Dado que en agua del Río Pilcomayo la fracción de cadmio asociada a la materia orgánica disuelta fue inferior al 20 %, es posible que el efecto protector por reducción de la biodisponibilidad no haya sido importante. En acuerdo con esto, cabe aclarar que las concentraciones de cadmio aplicadas por los autores citados fueron por debajo de 1mg Cd/L. Por lo tanto, la reducción de la biodisponibilidad del cadmio por materia orgánica en solución se observaría a concentraciones de cadmio más bajas que las medidas en la presente contribución.

La especiación predicha por el BLM indicó que el cadmio se encontró mayormente (>60 %) en su forma iónica libre en todos los tratamientos, en acuerdo con la gran estabilidad de la forma iónica libre de este metal. En general, esta especie es la dominante por debajo de 8,5 UpH. Los complejos de cadmio con cloruros y sulfatos son importantes a pH bajos ó cercanos a la neutralidad y la complejación por carbonatos es importante a valores de pH de 9 a 11 (US EPA, 2007). Por lo tanto, en el ensayo en agua del Río Pilcomayo el pH no contribuyó a reducir la biodisponibilidad del metal por formación de complejos.

En el presente ensayo, la alcalinidad del agua del Río Pilcomayo fue de 95 mg/L CaCO<sub>3</sub> y no se formaron especies de cadmio carbonatadas. Nigoyi et al. (2008) hallaron un aumento en la toxicidad del cadmio al incrementar la alcalinidad a 90 mg/L CaCO<sub>3</sub> pero reportaron también un incremento del pH a 8,6. La especiación del cadmio, en dichas condiciones, indicó que la segunda especie en importancia era CdHCO<sub>3</sub><sup>+</sup> y estos autores atribuyeron la mayor toxicidad observada a dicha especie. Por lo tanto, si bien en el presente ensayo y en el de Nigoyi et al. (2008) la alcalinidad fue similar, la diferencia fundamental que produjo la formación de especies bicarbonatadas reportada por estos autores, fue el mayor pH.

La concentración de cadmio total y disuelto en el Río Pilcomayo son bajas, pero la concentración de cadmio total supera por dos órdenes de magnitud la concentración de cadmio disuelto. En este caso, como en el resto de los metales estudiados en capítulos anteriores, la elevada carga de sólidos en suspensión que transporta este río ejerce un importante papel reduciendo la biodisponibilidad de dichos metales.

La CL<sub>50 96-h</sub> calculada en este trabajo para *C. decemmaculatus* en agua del Río Pilcomayo supera la CL<sub>50</sub> predicha por el BLM para *P. promelas* en la misma agua. Sin embargo, existen en la bibliografía reportes de CL<sub>50 96-h</sub> calculadas para *P. promelas* cercanos al valor calculado en el presente estudio. Birge et al. (1983) reportaron en ensayos estáticos una CL<sub>50</sub> de 7,16 mg Cd/L (cadmio total) para adultos de *P. promelas* en un agua con una dureza de 262,5 mg/L CaCO<sub>3</sub>. Sherman et al. (1987) hallaron valores de CL<sub>50</sub> para *P. promelas* de 4,39 mg Cd/L en agua de laboratorio, 3,52 mg Cd/L en agua de laguna con sedimentos y 2,91 mg Cd/L en agua de laguna. Por otra parte, Castillo y Longley (2001) hallaron una CL<sub>50</sub> de 17 µg Cd/L para individuos de *P.*

*promelas* de 4 a 6 días de vida en ensayos de renovación y en agua con una dureza de 266 mg/L CaCO<sub>3</sub>. Para salmónidos también se han reportado valores de CL<sub>50</sub> muy bajos. Brinkman y Hansen (2007) reportaron para alevinos de trucha marrón (*Salmo trutta*) recién emergidos valores de CL<sub>50 96-h</sub> de entre 1,23 y 10,1 µg Cd/L en aguas con una dureza de entre 29,2 y 151 mg/L CaCO<sub>3</sub>, respectivamente. Nigoyi et al. (2008), en juveniles de trucha arcoiris, reportaron en distintas calidades de agua, valores de CL<sub>50 96 h</sub> en un rango de 1,02 a 15,41 µg Cd/L. Cabe destacar que nuestro ensayo se realizó con individuos juveniles lo cual, probablemente, contribuyó a obtener un valor de CL<sub>50</sub> mayor del que se espera en estadios anteriores que suelen ser mas sensibles a los contaminantes. Aún así, es posible que *C. decemmaculatus* sea menos sensible al cadmio que *P. promelas* y existe en la bibliografía un trabajo previo de de la Torre et al. (1997) en el que el valor de CL<sub>50 96-h</sub> reportado para juveniles de *C. decemmaculatus* fue de 4 mg Cd/L. Las especies tropicales también serían menos sensibles al cadmio. Carvahalo Gomes et al. (2009) hallaron para la especie *Prochilodus vimboides* una CL<sub>50 96-h</sub> de 3,16 (2,9-3,40) mg Cd/L y de 7,42 (6,64-8,29) mg Cd/L para la especie *Leporinus macrocephalus* en agua con una dureza total de 40 mg/L CaCO<sub>3</sub>. Por otro lado, Nigoyi et al. (2004) obtuvieron para individuos de *Perca flavescens* de entre 8 y 12 gr de peso y en agua con una dureza de 120 mg/L CaCO<sub>3</sub>, una CL<sub>50</sub> de 8,14 mg Cd/L. En *Poecilia reticulata* en aguas de 105 a 209 mg/L CaCO<sub>3</sub> de dureza, la US EPA (2001) reportó valores de CL<sub>50</sub> de 3,8 y 11,1 mg Cd/L, respectivamente. La diferente sensibilidad de las especies al cadmio podría estar relacionada al tamaño, diferencias en la alimentación y en los diferentes niveles de calcio en el agua. Baldisserotto et al. (2004) han demostrado que una alimentación modestamente rica en calcio produjo, en trucha arcoiris, una disminución en la absorción de calcio en branquias que se vio acompañada por una disminución equivalente en la absorción de cadmio. A su vez, Nigoyi et al. (2008) observaron en trucha arcoiris que la unión del cadmio a la branquia es dependiente no sólo de la química del agua por la competencia entre calcio y cadmio por los mismos sitios de unión sino porque la densidad de dichos sitios se incrementa en aguas con bajo contenido de calcio.

El ensayo de toxicidad del cadmio en *C. decemmaculatus* contó con dos concentraciones más que no se tuvieron en cuenta para el cálculo de la CL<sub>50</sub>. Estas

concentraciones fueron de 7,96 y 9,9 mg Cd/L y las mortalidades fueron de 2 y 4 individuos, respectivamente. En ambos casos, al igual que en las concentraciones informadas, el 100 % del cadmio permaneció en solución según la especiación estimada por el BLM. Este patrón de mortalidad también fue observado en un ensayo posterior no informado en el que la  $CL_{50\ 96-h}$  obtenida fue muy similar. En la bibliografía no se ha reportado, hasta el momento, un patrón de este tipo. De acuerdo con estudios previos, a concentraciones bajas de cadmio, la unión de cadmio a las branquias ocurre a través de sitios de alta afinidad pero baja capacidad, es decir, sitios cuyo número es reducido pero la afinidad por el metal es superior. A mayores concentraciones de cadmio, el metal se une a sitios de baja afinidad y mayor capacidad. Los sitios que muestran saturación a bajas concentraciones de cadmio probablemente representen los sitios fisiológicamente activos que juegan un papel importante en la manutención de la homeostasis en peces (Nigoyi et al., 2008).

Para determinar si el patrón observado tiene una base fisiológica ó se trata de un artefacto experimental sería importante poder medir la concentración del metal en branquias para cada una de las concentraciones estudiadas.

## Capítulo 4.

### Toxicidad aguda de la plata en *C. decemmaculatus* en un agua con características químicas extremas

#### 1. Introducción

La plata es comparativamente rara en la corteza terrestre aunque su concentración tiende a ser naturalmente elevada en el petróleo crudo y en aguas y vapor de origen geotermal (Eisler, 1996).

Naturalmente, la plata ocurre en varios estados de oxidación, el más común es el elemental ( $\text{Ag}^0$ ) y el ion monovalente ( $\text{Ag}^+$ ). La adsorción es el proceso dominante que controla la partición de la plata en el agua y su movimiento en suelos y sedimentos. En aguas superficiales, la plata se puede encontrar como el ion monovalente, en combinación con sulfuro, bicarbonato, sulfato; como parte de iones más complejos con cloruros y sulfatos y adsorbida a material particulado (Eisler, 1996).

El uso principal de la plata es como haluro de plata en la manufactura de materiales para el procesado de imágenes fotográficas; otros productos incluyen joyería, monedas, tintas indelebles y cubiertos. En medicina, las sales de plata se utilizan como cáusticos, germicidas, antisépticos y astringentes (Eisler, 1996).

La plata no constituye un micronutriente esencial para plantas y animales y su forma iónica libre es la que tiene mayor importancia medioambiental ya que la plata en sus forma iónica libre es uno de los metales más tóxicos que se conocen para organismos acuáticos en ensayos de toxicidad en laboratorio (Eisler, 1996).

Las concentraciones más elevadas se encuentran usualmente en hígado y medula y, en menor medida, en músculos, piel y cerebro. En teleósteos el hígado es considerado el sitio de mayor acumulación. La inhibición enzimática que produce la plata se debe a la unión a los grupos sulfidrilos de algunas enzimas. La plata interactúa

competitivamente con el selenio, vitamina E y el cobre induciendo signos de deficiencia (Eisler, 1996).

Cuando la plata se encuentra presente como nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), es uno de los metales más tóxicos para los peces. La concentración letal media de la plata para peces de agua dulce se encuentra usualmente en el rango de 5–70  $\mu\text{g/L}$  (Kennedy, 2011). El  $\text{AgNO}_3$  es altamente tóxico debido a que en agua se disocia rápidamente para dar el ion plata, la especie más tóxica del metal. Para ejercer su efecto tóxico, el ion  $\text{Ag}^+$  entra a las células de las branquias, al menos en parte, por la misma ruta que el sodio, es decir, vía un canal apical de sodio impulsado por el gradiente eléctrico establecido por una  $\text{H}^+$ -ATPasa (Bury y Wood, 1999). Los protones tomados por la  $\text{H}^+$ -ATPasa son un producto de la hidratación del dióxido de carbono, reacción catalizada por la anhidrasa carbónica. El ion bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) resultante, también participa de la absorción apical de cloruro. Así como la plata se acumula en las branquias, también se acumula en el resto del cuerpo (Hogstrand et al., 1996; Wood et al., 1996; Webb y Wood, 1998). La toxicidad de este metal en los peces ocurre como resultado, primeramente, de la inhibición de la anhidrasa carbónica y luego de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa situada en la membrana basolateral de las branquias, conduciendo a una pérdida neta de sodio y cloruro. El desbalance ionoregulatorio resultante conduce, eventualmente, a un colapso circulatorio y la muerte del pez (Morgan et al., 2004).

### 1.1 Objetivo

Comprender los efectos de la química del agua sobre la toxicidad de la plata en un pez nativo *C. decemmaculatus*, y evaluar una posible extrapolación inter-específica del Ag-BLM en aguas superficiales con características químicas extremas a ser tenida en cuenta en una ampliación conceptual del modelo BLM.

## 2. Materiales y métodos

Este ensayo se realizó con agua colectada durante la campaña realizada en el mes de septiembre del año 2009 en Misión La Paz (Parte I, Figura 2). Para definir el rango de concentraciones a aplicarse en el ensayo, se realizó un ensayo de toxicidad preliminar en el que se expusieron 10 individuos juveniles aclimatados de *C.*

*decemmaculatus* a una concentración nominal de 1 mg Ag/L en un acuario con 2L de volumen del agua experimental durante 96 h. Posteriormente, se aplicó un diseño experimental que consistió en cuatro tratamientos ó concentraciones de plata más un grupo control sin el agregado del metal La solución stock utilizada para las distintas concentraciones ensayadas fue de 200 mg Ag/L y el reactivo de grado analítico utilizado fue AgNO<sub>3</sub>. El número inicial de peces por acuario fue de 10 y el volumen de agua experimental, 2 L.

### 3. Resultados

Los principales parámetros físico-químicos del agua colectada en el Río Pilcomayo en septiembre del año 2009 aparecen en la Tabla 12. Excepto los sulfatos, todos los valores se encontraron dentro del rango para el cual el BLM ha sido calibrado. Tanto la concentración total como la concentración disuelta de plata fueron no detectables (ND).

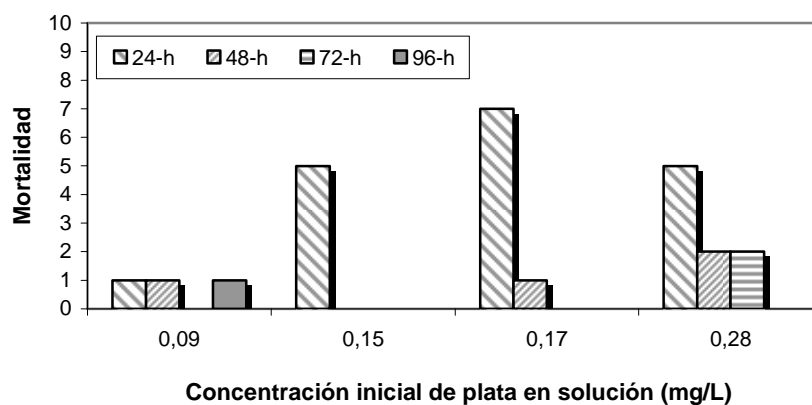
**Tabla 12.** Principales parámetros físico-químicos del agua del Río Pilcomayo. El caudal, temperatura, pH, oxígeno disuelto y conductividad eléctrica corresponden a mediciones *in situ*.

Parámetro	Unidad	Río Pilcomayo
Q	m <sup>3</sup> /s	19,3
T	°C	15,3
pH	UpH	7,7
OD	mg/L	-
Ca <sup>2+</sup>	mg/L	119
Mg <sup>2+</sup>	mg/L	46,2
Cl <sup>-</sup>	mg/L	208
Na <sup>+</sup>	mg/L	143,9
K <sup>+</sup>	mg/L	12
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	mg/L	364
COD	mg/L	3
Alc	mg/L CaCO <sub>3</sub>	142
Dureza	mg/L CaCO <sub>3</sub>	485,16
STS	mg/L	546
STD	mg/L	945
Ag T.	mg/L	ND
Ag D.	mg/L	ND

La comparación del caudal medio mensual del mes de septiembre del 2009 con los percentiles (P) calculados para los meses de mayo y septiembre del periodo 1961-2008 realizada en la Parte I de esta tesis (página 36), indicó que el caudal medio mensual del mes de septiembre del 2009 fue levemente superior al P<sub>50</sub>. Por lo tanto, los valores de los parámetro físico-químicos estudiados son los que representan las condiciones medias para el río en dicha época del año.

El pH y la temperatura medios del ensayo fueron de  $8,3 \pm 0,25$  UpH y  $25,1 \pm 1,2$  °C, respectivamente. Las concentraciones iniciales de plata medidas en los distintos tratamientos fueron 0,09; 0,15; 0,17 y 0,28 mg Ag/L más el grupo control en el que la concentración del metal fue inferior al límite de detección. La longitud estándar media de los individuos seleccionados fue de  $13,8 \pm 1,2$  mm.

No se observó mortalidad en el grupo control. El patrón de mortalidad observada en función del tiempo para cada tratamiento se muestra en la Figura 24. La mayor mortalidad ocurrió durante las primeras cinco horas en todos los tratamientos a excepción del tratamiento con menor concentración del metal, en el que también se produjo mortalidad a las 48 y a las 96 horas. En el tratamiento de mayor concentración, sólo un individuo sobrevivió. Luego de transcurridas las primeras horas del ensayo, se observó una suspensión blanquecina que tornó el agua nubosa.

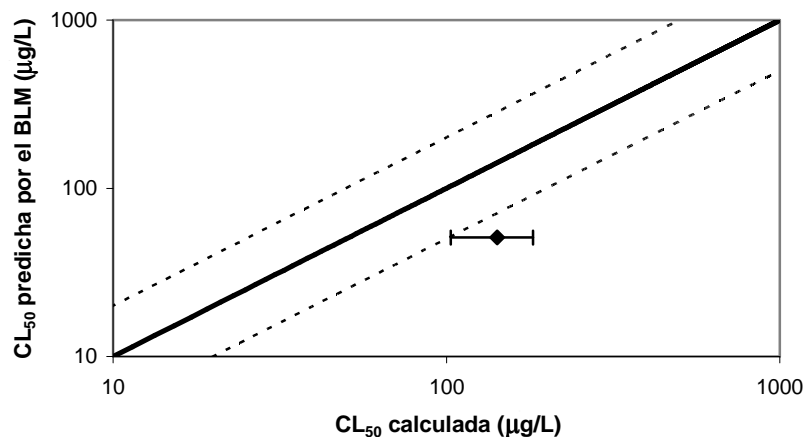


**Figura 24.** Mortalidad diaria (número de peces sin vida por día) en función de la concentración inicial de plata en solución en agua del Río Pilcomayo ( $n=10$ ).



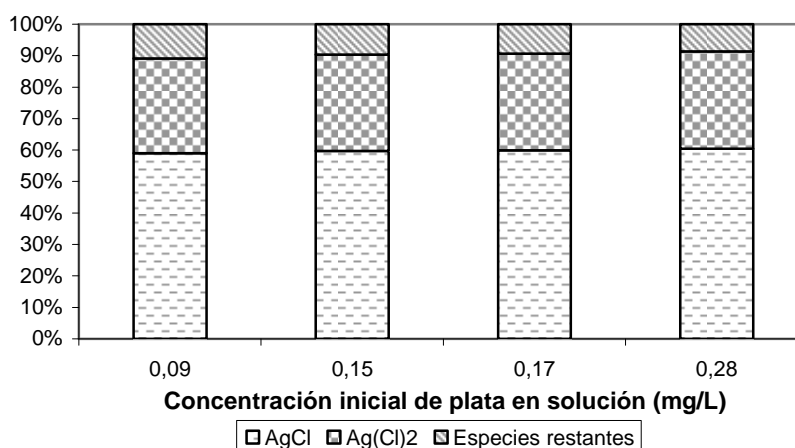
La toxicidad letal de la mediana de la plata ( $CL_{50}$ , mg Ag/L) a las 24, 48, 72 y 96 horas de iniciado el ensayo ( $CL_{50\ 24-h}$ ,  $CL_{50\ 48-h}$ ,  $CL_{50\ 72-h}$  y  $CL_{50\ 96-h}$ ) con sus correspondientes intervalos de confianza calculadas aplicando el método PROBIT fueron: 0,21 mg Ag/L (0,15-0,33), 0,17 mg Ag/L (0,12-0,22), 0,15 mg Ag/L (0,11-0,19) y 0,14 mg Ag/L (0,10-0,18), respectivamente. La  $CL_{50\ 96-h}$  predicha por el BLM para *P. promelas* en el agua del ensayo fue de 0,051 mg Ag/L.

En la Figura 25 se muestra la  $CL_{50-96\ h}$  predicha por el BLM para *P. promelas* en función del mismo parámetro calculado para *C. decemmaculatus*. Como puede observarse, la  $CL_{50\ 96-h}$  predicha por el BLM no fue precisa ya que no se encontró dentro del rango de más/menos un factor de 2 respecto de la concordancia perfecta entre  $CL_{50}$  experimental y predicha por el modelo.



**Figura 25.** Toxicidad de la plata ( $CL_{50}$ , en  $\mu\text{g Ag/L}$ ) calculada para *C. decemmaculatus* en agua del Río Pilcomayo (♦) comparada con la toxicidad de la plata predicha por el BLM para *P. promelas* en la misma agua. La línea continua representa una relación 1:1. Las líneas discontinuas representan predicciones dentro del factor  $\pm 2$ . Las barras de error representan los intervalos de confianza del 95 %.

La especiación predicha por el BLM para cada concentración inicial de plata medida (Figura 26) mostró que la especie más abundante fue el AgCl (60 %) seguida por el  $\text{Ag}(\text{Cl})_2$  (30 %). La contribución de cada especie fue la misma para las distintas concentraciones de plata medidas en los tratamientos.



**Figura 26.** Especiación de la plata, predicha por el BLM, para cada una de las concentraciones de plata medidas en agua del Río Pilcomayo. Dado que en el grupo control la concentración de plata fue no detectable, no se muestra la especiación. Las especies de plata se encuentran expresadas como porcentajes de la concentración total inicial de plata en solución.

#### 4. Discusión

El Río Pilcomayo se caracteriza, como se ha venido describiendo en esta tesis, por la elevada dureza de sus aguas. El efecto protector de la dureza del agua en la reducción de la toxicidad del cobre ha sido bien documentado, en cambio, los efectos de la dureza en la toxicidad de la plata no parecen ser claros. Según Paquin et al. (2002), cuando la plata se encuentra compitiendo con el calcio por el ligando biótico, el calcio tiende a tener menor importancia, como factor protector, que la que parece tener para otros metales. Bury et al. (1999) reportaron que un incremento de calcio de 2 a 80 mg/L tenía un influencia muy pequeña en la  $CL_{50\ 96-h}$  para trucha arcoiris y *P. promelas* siendo el valor reportado de 0,008 mg/L para juveniles de *P. promelas*. Asimismo, Karen et al. (1999) observaron que la materia orgánica disuelta tuvo mayor influencia que la dureza en la toxicidad de la plata en trucha arcoiris, *P. promelas* y *D. magna* en aguas naturales.

Por otra parte, Erickson et al. (1998) reportaron una reducción substancial en la toxicidad de la plata en *P. promelas* (aumento de 0,005 a 0,012 mg/L en la  $CL_{50\ 96-h}$ ) con un incremento de la dureza de 48 a 249 mg/L  $CaCO_3$ . Bielmyer et al. (2007) observaron que *C. dubia* y *P. promelas* eran menos sensibles a la plata en aguas con una combinación de elevada dureza y materia orgánica disuelta. En agua con una dureza de 225 mg/L  $CaCO_3$  estos autores hallaron para *P. promelas* de siete días de vida una  $CL_{50}$

$96\text{-h}$  de 0,021 (0,019-0,023) mg/L. Más allá de los resultados opuestos que se han informado, es posible que la menor toxicidad de la plata observada en *C. decemmaculatus* se deba, en parte, a un efecto protector dado por la elevada dureza del agua del Río Pilcomayo.

Otro de los cationes mayoritarios más abundantes en el Río Pilcomayo es el sodio. Los altos niveles de sodio podrían inhibir la acumulación de plata por competencia. Sin embargo, Bury y Wood (1999) hallaron que un tercio de la acumulación de plata continuaba en presencia de un bloqueador del canal de sodio y la ATPasa ó elevados niveles de sodio en el agua. Asimismo, Erickson et al. (1998) reportaron un efecto no significativo sobre la toxicidad de la plata en *P. promelas* cuando se agregaron 2 meq/L de sulfato de sodio al agua del ensayo. Esto significa que en las células de las branquias, alternativamente ó adicionalmente, existen múltiples caminos para la entrada apical de plata. Esto implica que en aguas con altos niveles de sodio no debería observarse una toxicidad menor respecto de aguas con menor contenido de sodio, por lo tanto, los elevados niveles de sodio en agua del Río Pilcomayo no ejercieron un efecto protector por competencia a nivel del ligando biótico.

Los niveles de materia orgánica disuelta en el Río Pilcomayo son relativamente bajos y de acuerdo con la especiación predicha por el BLM su contribución fue mínima. Es más, Rose-Janes y Playle (2000) remarcaron la fuerte unión de la plata a las branquias de trucha arcoiris y la unión relativamente débil de la plata a la materia orgánica. Sin embargo, otros autores han reportado una reducción en la toxicidad de la plata por aumento en la concentración de materia orgánica en solución. Bury et al. (1999) observaron que un incremento de 0,3 a 5,8 mg/L en la concentración de carbono orgánico disuelto redujo la toxicidad aguda de la plata en trucha arco iris y *P. promelas*. Erickson et al. (1998) reportaron aumentos significativos de los valores de  $CL_{50\ 96\text{-h}}$  en ensayos con *P. promelas* de 30 días de vida cuando se incrementaba el nivel de carbono orgánico disuelto (de 1 a 11 mg C/L).

En la especiación predicha por el BLM, la formación de  $AgCl_2$  y  $AgCl$  representó aproximadamente el 90% en todos los tratamientos. En este sentido, los cloruros pueden ejercer un efecto protector a través de la complejación. Este efecto protector ha sido observado para trucha arco iris, y el alto nivel de cloruros en el Río

Pilcomayo podría haber reducido también la toxicidad de la plata en *C. decemmaculatus*. Sin embargo, la formación de AgCl parece no tener una influencia substancial en la sensibilidad a la plata en otras especies estudiadas (Bielmyer et al., 2008).

El pH constituye otro parámetro que puede influenciar la toxicidad de la plata a través de la especiación. El pH medio del ensayo de toxicidad en *C. decemmaculatus* fue de 8,3. Erickson et al. (1998) reportaron una reducción en la toxicidad de la plata al incrementarse el pH. La CL<sub>50 96-h</sub> a pH 8,6 fue tres veces superior que a pH 7,2. Por lo tanto, es posible que en el ensayo en agua del Río Pilcomayo el pH ejerciera un efecto protector reduciendo la biodisponibilidad del metal y, por ende, la toxicidad de la plata en esta especie.

La CL<sub>50 96-h</sub> predicha por el BLM para *P. promelas* en agua del Río Pilcomayo fue inferior a la calculada para *C. decemmaculatus*, por lo tanto, el modelo sobrestimó la toxicidad. Bielmyer et al. (2007) en su estudio de validación del BLM hallaron que solo el 50 % de las predicciones del modelo para *P. promelas* fueron precisas respecto a los datos experimentales. La menor toxicidad observada en *C. decemmaculatus* podría deberse a que esta especie es menos sensible a la toxicidad de la plata respecto de otras especies. Aun así, debe tenerse en cuenta que casi todos los estudios previamente citados respecto de la toxicidad de la plata en *P. promelas* se realizaron en estadios de vida más tempranos de la especie. En la presente contribución se trabajó con juveniles, que suelen ser menos sensibles a los contaminantes que los estadios más tempranos. En este sentido, Bielmyer et al. (2007) informaron que los valores de CL<sub>50 96-h</sub> se incrementaron con la edad de los peces.

En la presente contribución, se observó un claro patrón de mortalidad. El mayor número de muertes se produjo durante las primeras cinco horas del ensayo. Si bien no se midió la acumulación de plata en las branquias, este patrón de mortalidad podría corresponder al pico y posterior disminución en la acumulación de plata en la branquia observada en ensayos estáticos de toxicidad aguda. Nebeker et al. (1983); Erickson et al. (1998) y Morgan et al. (2004) atribuyeron este patrón de acumulación de plata en las branquias a cambios en la biodisponibilidad debidos a la complejación del metal con la materia orgánica en incremento en los ensayos estáticos. En la presente contribución, las

concentraciones de plata en los distintos tratamientos fueron superiores respecto de otros ensayos y dado que se produjo precipitación, la cual fue visiblemente notoria, posiblemente los peces estuvieron en contacto con una mayor concentración del metal disuelto durante los primeros minutos-horas del ensayo, lo cual se reflejó en el patrón de mortalidad observado.



# *Parte III*

*Estudio de la remediación de aguas con plantas acuáticas flotantes*

## Capítulo 1.

### Remoción de nutrientes e interacción entre *Salvinia minima* y *Lemna gibba*: efecto sobre el crecimiento en distintos medios de cultivo

#### 1. Introducción

La aplicación de combinaciones de especies para la fitorremediación en humedales artificiales requiere del estudio de las tasas de remoción de los contaminantes y de las tasas de crecimiento, ya que, como se observa en la naturaleza, ciertas especies son desplazadas en ciertas épocas del año en las que imperan determinadas condiciones climáticas y/o frente a variaciones en los principales parámetros físico-químicos del ambiente acuático en el que habitan.

Según Gopal y Goel (1993) la competencia en el medio acuático ocurre fundamentalmente entre especies con forma de crecimiento semejante que ocupan la misma posición en la columna de agua. *L. gibba* y *S. minima*, son ambas macrófitas flotantes que crecen formando carpetas en lagunas y arroyos. En algunas ocasiones la elevada densidad que alcanzan puede producir la disminución en la difusión de oxígeno y en el pasaje de luz hacia la columna de agua.

La disponibilidad de nutrientes afecta la estructura de la comunidad en ambientes acuáticos naturales (Tilman, 1984). Por lo tanto, la competencia entre especies se encuentra posiblemente influenciada por tal condición del medio, pudiendo modificarse la interacción entre especies frente a distintas disponibilidades de nutrientes. En este sentido, Van et al. (1999) encontraron que *Hydrilla verticillata* era más competitiva que *Vallisneria americana* en condiciones de alta carga de nutrientes pero lo contrario ocurría en condiciones menos fértiles. Según Lambers et al. (1998), en experimentos a corto plazo especialmente en ambientes con recursos no limitantes, los rasgos que llevan a un rápido crecimiento contribuyen al éxito competitivo. Clatworthy y Harper (1962) realizaron ensayos de 6 días con distintas especies de los géneros *Lemna* y *Salvinia* y concluyeron que el éxito de una especie en cultivo mixto no podía

predecirse a partir de los resultados obtenidos en cultivos puros. Es probable que varios factores adicionales influyan en la interacción competitiva como ser la filogenia (Webb et al., 2006), competencia intraespecífica (Weiner, 1990), disponibilidad del recurso (Grime, 1973) y sus interacciones (Bertness y Callaway, 1994).

### 1.1 Objetivo

Con vistas a evaluar la posibilidad de utilizar las especies *S. minima* y *L. gibba* en humedales artificiales de tratamiento de efluentes con elevada carga de nutrientes, el objetivo del presente estudio fue el de determinar las tasas de crecimiento relativas medias y remoción de nutrientes de dichas especies en cultivos puros y mixtos y en diferentes medios de cultivo.

## 2. Materiales y métodos

Los ejemplares de las especies *L. gibba* y *S. minima* fueron recolectados de un monocultivo que se mantiene al aire libre en el parque del Museo Argentino de Ciencias Naturales *Bernardino Rivadavia* (MACN). Se las trasladó al invernáculo donde se las mantuvo en recipientes con agua corriente de red para permitir su aclimatación a las condiciones de temperatura y humedad durante al menos 6 días. Se estudió por quintuplicado el crecimiento y la remoción de nutrientes por ambas especies en un ensayo estático, durante siete días. Los medios de cultivo aplicados fueron: agua corriente, solución nutritiva *Lemna* (APHA, AWWA, WPCF, 1992) y medio Hutner 1/10 modificado según Vermaat y Hanif (1998). La Tabla 13 muestra el diseño experimental aplicado y las Tablas 14 y 15 muestran la composición de los medios de cultivo aplicados.

Dado que en una misma planta se pueden encontrar frondes en distintos estados de desarrollo, subjetivamente, se decidió incluir en el conteo de frondes, para la especie *S. minima*, a aquellos estadíos en los que las frondes estaban cerradas pero contaban con una longitud  $\geq 2$  mm y presentaban color verde, aunque este fuese pálido. En el caso de *L. gibba*, se consideró fronde también a aquellas estructuras con la mitad del tamaño de un fronde completamente formado.



Se utilizaron bandejas plásticas de 66,5 cm<sup>2</sup> de superficie en las que se colocaron 160 ml de medio de cultivo (3 cm de profundidad). Se seleccionaron las plantas con mejor aspecto, es decir, aquellas con los frondes de un color verde intenso. Se las lavó cuidadosamente con agua corriente de red y luego con agua desionizada y se dispuso: 85-86 frondes de *L. gibba* y 63-64 frondes de *S. minima* en cada tratamiento de monocultivo y 35-36 y 38-39 frondes de *L. gibba* y *S. minima*, respectivamente, en los tratamientos de cultivo mixto (Figura 27).

**Tabla 13.** Diseño experimental.

Medio de cultivo	Tipo de Cultivo	Especie
Agua corriente	Monocultivo	<i>S. minima</i>
	Monocultivo	<i>L. gibba</i>
	Mixto	<i>S. minima</i> + <i>L. gibba</i>
Solución nutritiva Lemna	Monocultivo	<i>S. minima</i>
	Monocultivo	<i>L. gibba</i>
	Mixto	<i>S. minima</i> + <i>L. gibba</i>
Hutner 1/10	Monocultivo	<i>S. minima</i>
	Monocultivo	<i>L. gibba</i>
	Mixto	<i>S. minima</i> + <i>L. gibba</i>

**Tabla 14.** Medio Hutner 1/10 modificado según Vermaat y Hanif (1998)

Reactivos		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	mg/L	20
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	mg/L	40
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	mg/L	50
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	mg/L	2,5
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	mg/L	1,5
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	mg/L	6,5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	mg/L	1,5
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	mg/L	2,5
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	mg/L	50
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	mg/L	16,2

En todos los casos se buscó cubrir las 2/3 partes de la superficie. En adición al fotoperíodo natural al que expuestas las plantas, se utilizó luz fluorescente blanca fría con un fotoperíodo de 15:9hs (luz/oscuridad). Se midió la temperatura, pH y conductividad eléctrica al inicio, a los tres días y al finalizar el ensayo. Una vez finalizado el ensayo, se contó el número de frondes en cada unidad experimental y las biomásas finales se colocaron en estufa a 60 ° C para obtener los pesos secos finales (*PSf*). Los pesos secos iniciales (*PSi*) de ambas especies se estimaron a partir del peso seco determinado en plantas provenientes del mismo cultivo y con el mismo número de frondes que los utilizados en los tratamientos anteriormente descritos. La remoción de nitrógeno se analizó como remoción de especies de nitrógeno inorgánico disuelto (NID) definido como sumatoria de amonio y nitratos+nitritos. Para analizar la fitoacumulación de fósforo, el mismo se determinó como especies de fósforo reactivo soluble (PRS). Al finalizar el ensayo, la concentración final de los nutrientes seleccionados para analizar se determinó en tres replicas de cada tratamiento seleccionadas al azar.

**Tabla 15.** Solución nutritiva *Lemna* (APHA, AWWA, WPCF, 1992).

Reactivos		
NaNO <sub>3</sub>	gr/L	25,5
NaHCO <sub>3</sub>	gr/L	15
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	gr/L	1,04
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	gr/L	4,41
MgCl <sub>2</sub>	gr/L	5,7
FeCl <sub>3</sub>	gr/L	0,096
MnCl <sub>2</sub>	gr/L	0,264
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	gr/L	0,3
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	gr/L	14,7
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	gr/L	0,186
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	gr/L	0,00726
ZnCl <sub>2</sub>	gr/L	0,00327

Para evaluar la eficiencia de *S. minima* en la remoción de NID y PRS, se calculó el porcentaje de remoción (%*R*) de cada nutriente de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% R = 100 \times \left( 1 - \frac{C_f}{C_i} \right)$$

donde  $C_f$  y  $C_i$  corresponden a las concentración inicial y final de cada nutriente, respectivamente.

La tasa de crecimiento relativa media (MRGR) se estimó según la ecuación propuesta por Hunt (1978):

$$MRGR = \frac{\ln PS_f - \ln PS_i}{\Delta t}$$

donde  $PS_f$  y  $PS_i$  se refieren al peso seco final e inicial, respectivamente, y  $\Delta t$  corresponde a la duración del ensayo.



**Figura 27.** Unidades experimentales. Arriba, monocultivo de *S. minima* (izquierda) y *L. gibba* (derecha) y cultivo mixto (abajo).

Se examinó el cumplimiento de los supuestos de normalidad (test de Lilliefors) y homogeneidad de varianzas (test de Levene) y se aplicó análisis de varianza ANOVA de dos factores para analizar la MRGR en función del medio de cultivo ó tratamiento y del tipo de cultivo (monocultivo y cultivo mixto). Se realizaron comparaciones con el

test de Fisher cuando se hallaron diferencias significativas entre tratamientos (Zar, 1996). Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el programa STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA).

### 3. Resultados

La temperatura media del ensayo fue de  $15,9 \pm 4$  °C. El pH medio en los tratamientos con agua corriente, solución nutritiva *Lemna* y medio Hutner 1/10 modificado fue de  $8,03 \pm 0,15$  UpH;  $8,32 \pm 0,09$  UpH y  $7,72 \pm 0,7$  UpH, respectivamente.

Los valores de biomasa inicial y final para cada especie en monocultivo y cultivo mixto pueden observarse en la Tabla 16. En ningún tratamiento en monocultivo las frondes llegaron a superponerse, no existiendo efecto de sombreado ni interferencia por espacio.

El rango de MRGR para *L. gibba* (Tabla 17) en monocultivo fue 91,42-124,15 /día. Por otro lado, los valores de MRGR para *S. minima* variaron entre 57,47-65,31 /día. Dado que no se halló interacción significativa entre tipo de cultivo (puro y mixto) y medio de cultivo para ninguna de las especies (Tabla 18), se analizó por separado cada variable aplicando ANOVA de un factor.

**Tabla 16.** Peso seco de biomasa seca total inicial y final para cada especie en monocultivo y cultivo mixto.

		Peso seco biomasa total (gr)	
		Monocultivo	Cultivo mixto
<b>Inicial</b>	<i>L. gibba</i>	0,05	0,02
	<i>S. minima</i>	0,14	0,09
<b>Agua corriente</b>	<i>L. gibba</i>	$0,09 \pm 0,007$	$0,04 \pm 0,002$
	<i>S. minima</i>	$0,22 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$
<b>Solución nutritiva <i>Lemna</i></b>	<i>L. gibba</i>	$0,10 \pm 0,007$	$0,04 \pm 0,0006$
	<i>S. minima</i>	$0,21 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$
<b>Medio Hutner 1/10</b>	<i>L. gibba</i>	$0,12 \pm 0,02$	$0,05 \pm 0,006$
	<i>S. minima</i>	$0,23 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$

En monocultivo (Tabla 17), *L. gibba* presentó un MRGR significativamente mayor en medio Hutner 1/10 modificado, en cambio, *S. minima* creció a una tasa similar en los tres medios de cultivo en ambos tipos de cultivo (puro y mixto). En cultivo mixto, *L. gibba* presentó un crecimiento significativamente menor respecto del cultivo puro, siendo aún menor en solución nutritiva *Lemna* respecto que en medio Hutner 1/10.

**Tabla 17.** Tasa de crecimiento relativa media (MRGR) de las especies *S. minima* y *L. gibba* según el tipo de cultivo y medio nutritivo. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre monocultivo y cultivo mixto y entre medios de cultivo para una misma especie.

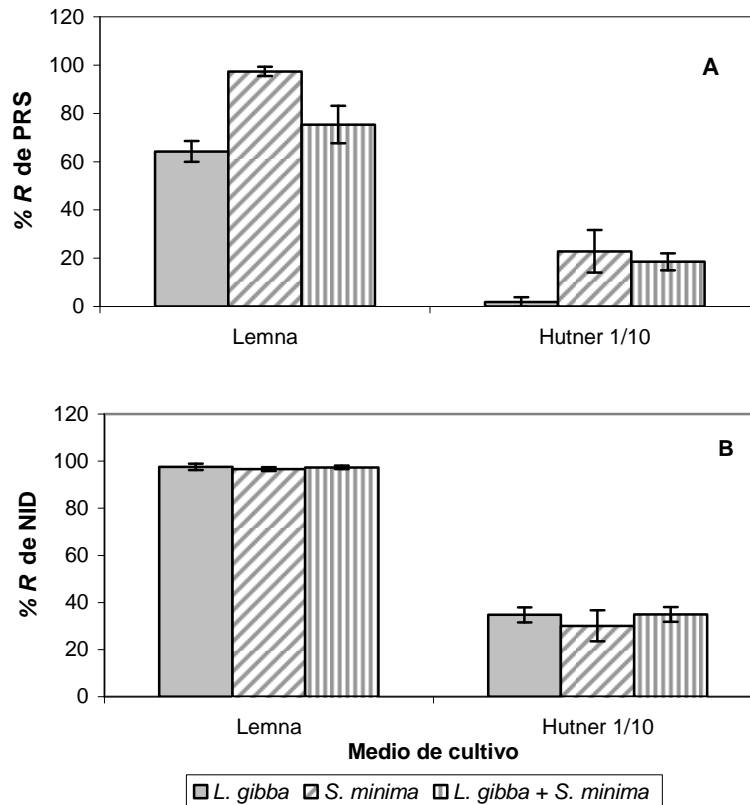
Medio de Cultivo	Especie	MRGR (/día)	
		Monocultivo	Cultivo mixto
Agua corriente	<i>S. minima</i>	62,57 ± 8,66	64,41 ± 16,32
	<i>L. gibba</i>	91,42 ± 10,5a	75,67 ± 6,8c
Solución nutritiva <i>Lemna</i>	<i>S. minima</i>	57,47 ± 9,93	50,37 ± 12,2
	<i>L. gibba</i>	97,95 ± 9,3a	71,15 ± 2,24c
Hutner 1/10	<i>S. minima</i>	65,31 ± 7,96	56,34 ± 14,02
	<i>L. gibba</i>	124,15 ± 21,3b	99,6 ± 18,6d

**Tabla 18.** Estadístico *F*; nivel de significación (*p*) y grados de libertad (GL) del ANOVA de dos factores aplicado a la MRGR para *S. minima* y *L. gibba*.

	<i>S. minima</i>			<i>L. gibba</i>		
	Medio nutritivo	Tipo de Cultivo	Interacción	Medio nutritivo	Tipo de Cultivo	Interacción
<b><i>F</i></b>	1,7227	1,1901	0,5888	14,752	21,431	0,487
<b>GL</b>	2	1	2	2	1	2
<b><i>p</i></b>	0,19994	0,2861	0,5628	<0,0001	<0,001	0,6204

La Figura 28 muestra el porcentaje de remoción de las especies de nitrógeno inorgánico y de fósforo reactivo soluble (NID y PRS, respectivamente) para cada especie en monocultivo y para los cultivos mixtos en cada medio de cultivo. En

solución nutritiva *Lemna*, *S. minima* removió casi totalmente el fósforo como PRS (97,2 %) y el nitrógeno como NID (96,4 %) presentes (Figura 28 A y B).



**Figura 28.** Remoción (%) de PRS (A) y NID (B) de cada especie en monocultivo y en los cultivos mixtos en solución nutritiva *Lemna* y medio Hutner 1/10.

*L. gibba*, por otro lado, removió el 64,3 % del P y casi la totalidad (97,1 %) del nitrógeno inorgánico disuelto. En medio de cultivo Hutner 1/10 modificado, *S. minima* removió el 23 % del P y el 54,7 % del N y *L. gibba* casi no consumió especies de fósforo solubles (1,45 %) y redujo el NID al 53,8 % (Figura 28 A y B). En los cultivos mixtos, la remoción de PRS en solución nutritiva *Lemna* fue similar a la remoción de *L. gibba* en monocultivo. En medio Hutner 1/10, la remoción fue similar a la remoción de *S. minima* en monocultivo. La remoción de NID en los sistemas mixtos y en ambos medios de cultivo fue similar a la remoción de ambas especies en monocultivo.

#### 4. Discusión

En los monocultivos se observó una clara diferencia en la remoción de especies de nitrógeno inorgánico y fósforo solubles de tanto de *S. minima* como de *L. gibba* entre medios de cultivo, siendo superior la remoción en solución nutritiva *Lemna*. La principal diferencia entre ésta solución nutritiva y el medio Hutner 1/10 modificado radica en que la solución nutritiva *Lemna* está caracterizada por ser rica en nitrógeno respecto a fósforo en una relación NID:PRS = 67:1. El medio Hutner 1/10 modificado, en cambio, presenta una relación NID:PRS = 4:1. La gran reducción de las especies nitrogenadas en solución nutritiva *Lemna* podría explicarse, en parte, por un consumo de tipo luxuriante de ambas especies. Esto ha sido observado también por Schenker y Harfmann (2010) en un ensayo similar, a diferencia que estos autores observaron una gran reducción del nitrógeno sólo para la lemnácea y no para el helecho. Por otra parte, Gaudet (1973) reportó un consumo luxuriante de nitrógeno (en cultivo y en condiciones naturales) y fósforo (sólo en cultivo) por *S. minima*. En este sentido, Schenker y Harfmann (2010) informaron que la reducción de nitrógeno en el medio de cultivo podría deberse también al consumo por parte de bacterias denitrificantes presentes en la superficie de las frondes. Estas bacterias convertirían los compuestos inorgánicos nitrogenados en nitrógeno atmosférico.

El crecimiento de *L. gibba* en medio Hutner 1/10 fue significativamente superior al estimado en solución nutritiva *Lemna*. *Salvinia minima*, por su parte, no presentó un crecimiento diferencial entre medios de cultivo. Cabe destacar que la solución nutritiva *Lemna* el nitrógeno se suplementa únicamente como nitrato. En medio de cultivo Hutner 1/10 modificado, como nitrato y amonio. El amonio es la forma de nitrógeno inorgánico preferida por la mayor parte de las macrófitas acuáticas de agua dulce. La asimilación del amonio es menos compleja que la de nitrato, requiere un menor gasto energético. En este sentido, Aoi y Hayashi (1996) informaron un consumo preferencial de amonio en *Spirodela oligorrhiza* y *Pistia stratiotes*. Generalmente, las tasas de crecimiento más elevadas se hallaron en plantas creciendo con amonio en el medio, las menores en plantas creciendo con nitrato y tasas intermedias se hallaron en plantas que crecieron con ambas formas de nitrógeno en el medio (Jampeetong y Brix, 2009). Por otra parte, muchas plantas crecen mejor en presencia de amonio y nitratos suministrados

en forma conjunta porque la absorción y asimilación de las dos formas de nitrógeno promueve el balance catión-anión en la planta (Taiz y Zeiger, 2010). Posiblemente, la presencia de nitrógeno como amonio explique la mayor tasa de crecimiento de *L. gibba* en medio Hutner 1/10 modificado. El mayor crecimiento podría deberse a que este medio también presentó un pH menor (7,72) frente al pH de la solución nutritiva *Lemna* (8,32). En el caso de *S. minima* existe un estudio previo en el que, como en el presente, tanto *Salvinia auriculata* y *S. minima* no mostraron diferencias en el peso seco final cuando crecieron con nitrógeno en forma de amonio ó nitrato en el medio (Jampeetong y Brix, 2009).

En los sistemas mixtos la remoción de las especies de nitrógeno inorgánico y fósforo solubles fue similar a la remoción de las especies en monocultivo. Es decir, no se vio un efecto sinérgico en la remoción de estos macronutrientes, indicando que el uso simultáneo de ambas especies no permitiría una mayor eficiencia en la remoción de los mismos.

La disminución del crecimiento de *L. gibba* creciendo en cultivo mixto con *S. minima* permite afirmar que la presencia de esta última afectó negativamente el crecimiento de *L. gibba*, en los medios de cultivo aplicados y en las condiciones experimentales del presente ensayo. Grime (1977) ha sugerido que las especies con mayor tasa de crecimiento relativa son competidoras más efectivas. Sin embargo, y de acuerdo a Tilman (1988), las especies capaces de acceder a recursos limitados son las mejores competidoras. Esto mismo fue propuesto por Clatworthy y Harper (1962). Dickinson y Miller (1998) estudiaron en un humedal la cobertura superficial de tres macrófitas flotantes, entre ellas *S. minima*, y observaron efectos negativos de *S. minima* sobre el crecimiento de *Azolla caroliniana* y *Spirodela punctata*. Los autores atribuyeron el efecto de *S. minima* sobre las otras dos especies a su mayor tamaño y a su flotabilidad. Asimismo, Moen y Cohen (1989) observaron para las especies sumergidas *Potamogeton pectinatus* y *Myriophyllum exalbescens* que la primera produjo una reducción en el peso de *M. exalbescens*. De acuerdo a los autores, el efecto de *P. pectinatus* se debería a su rápido crecimiento y a que forma una copa de hojas cerca de la superficie del agua que la haría una competidora superior por luz. Si bien en los cultivos mixtos de la presente contribución no se produjo superposición de las frondes



de *L. gibba*, *S. minima* presenta un volumen mucho mayor sobre la superficie del medio de cultivo que podría haber sombreado las frondes de *L. gibba*.

## Capítulo 2.

### Remoción de nutrientes y cobre por *Salvinia minima*.

#### Análisis de compartimentalización del metal en la biomasa.

### 1. Introducción

El cobre es un micronutriente esencial para el crecimiento de las plantas, con requerimientos mínimos, generalmente, por debajo de los 5 µg/gr de tejido (Ait Ali et al., 2004). Es un constituyente de la plastocianina, proteína contenida en los cloroplastos, que forma parte de la cadena de transporte de electrones conectando los dos sistemas fotoquímicos de la fotosíntesis. Asimismo, el cobre funciona como activador ó componente de ciertas enzimas involucradas en una variedad de procesos bioquímicos, como la citocromo c oxidasa y la Cu-Zn superóxido dismutasa. Es decir, el cobre es esencial para el normal desarrollo de la fotosíntesis, respiración, distribución de carbohidratos, metabolismo del nitrógeno, producción de semillas y resistencia a enfermedades (Jadia y Fulekar, 2009). Sin embargo, a concentraciones superiores a 20 µg/gr de biomasa seca, el cobre es tóxico produciendo clorosis, y deficiencia de hierro por inhibición de la traslocación del hierro en la planta. Asimismo, niveles tóxicos de cobre inhiben el crecimiento de la raíz por daño en la integridad de la membrana plasmática (Handami y Bair, 2004).

Según Baker (1981) las plantas poseen tres modos de tolerar la presencia de grandes cantidades de metales en el ambiente. Uno es la *exclusión*, es decir, el transporte de metales es restringido y se mantiene constante la concentración de los mismos en la biomasa. Para ello, las plantas alteran la permeabilidad de las membranas, modifican la capacidad de unión a las paredes celulares ó exudan sustancias quelantes. El segundo modo es la *inclusión*. Estas especies reflejan la concentración del metal en el ambiente. Toleran las elevadas concentraciones por la producción de sustancias intracelulares quelantes ó alteran el patrón de compartimentalización mediante el

almacenamiento de metales en zonas no sensibles. Por último, algunas especies son *bioacumuladoras*, acumulan metales tanto a bajas como a altas concentraciones del metal en el ambiente. Estas últimas, son las que despiertan mayor interés en lo que respecta a la fitorremediación.

En el caso de los metales pesados, el proceso de fitoacumulación por plantas acuáticas usualmente consta de dos etapas: un proceso inicial, rápido y reversible de unión del metal (biosorción) seguido por la bioacumulación, proceso lento e irreversible. La biosorción inicial puede ocurrir vía complejación, coordinación, quelación, intercambio iónico, adsorción y microprecipitación. La bioacumulación constituye un modo activo de acumulación de metales. Este proceso es dependiente de las actividades metabólicas las que, a su vez, pueden ser afectadas por la presencia de los iones metálicos (Wilde y Benemann, 1993).

De acuerdo con Brown (1982) los compartimentos principales en los que los metales pesados pueden acumularse son el intercelular, el extracelular y el intracelular. El metal *intercelular* es aquel disuelto en los líquidos que rodean las células ó que forma depósitos sobre las mismas. El metal *extracelular* es aquel que se une temporariamente en una forma no intercambiable a grupos cargados que forman parte de los componentes de la pared celular ó de la superficie externa de la membrana plasmática. Dichos sitios de unión son generalmente aniónicos, por lo tanto, los iones que se adsorben de esta forma son cationes. También debe tenerse en cuenta que elementos diferentes se unen a los sitios de intercambio de cationes con diferentes afinidades. El metal *intracelular* es aquel que se encuentra dentro de las células, ya sea en forma soluble ó insoluble; debe tenerse en cuenta que una molécula con carga eléctrica debe combinarse con una molécula transportadora para cruzar la membrana rápidamente, lo cual es un proceso que requiere energía.

El estudio de la compartimentalización del metal en vegetales comenzó con el uso de agentes quelantes. Inicialmente, los agentes quelantes se utilizaron con el propósito de controlar, en los medios de cultivo, la concentración de metales traza necesarios para el crecimiento. Más tarde, y dado el creciente interés sobre el efecto tóxico de los metales traza, dichos agentes quelantes comenzaron a utilizarse para distinguir el metal adsorbido del intracelular (Bates et al., 1982). Los primeros trabajos

de compartimentalización se realizaron en algas unicelulares y fitoplancton. Luego, el análisis de compartimentalización del metal mediante el uso de quelantes, se aplicó en algas y briofitas (Brown y Back, 1985; Maeda et al., 1990; Noraho y Gaur, 1996; Olguín et al., 2005). Más recientemente, se ha aplicado en macrófitas, impulsado por el uso de plantas acuáticas ya sea especies emergentes ó flotantes para la remoción de metales pesados de aguas residuales. El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) es uno de los agentes quelantes más eficientes y utilizados en los estudios de compartimentalización de metal en plantas.

Uno de los criterios para medir la capacidad de una especie de bioconcentrar un elemento en sus tejidos teniendo en cuenta la concentración del elemento en el sustrato ó en solución es el Factor de Bioconcentración (FBC) que permite también comparar esta capacidad entre especies. Asimismo, Zayed et al., (1998) han propuesto dos criterios arbitrarios para determinar si una especie es hiperacumuladora: a) FBC >1000 y b) más del 0,5 % del peso seco final corresponde al elemento acumulado (Olguín et al., 2002).

El análisis de la capacidad de una especie de fitoacumular metales pesados también debe contemplar que ocurre con la fitoacumulación en medios con mayor ó menor contenido de aquellos nutrientes críticos para el desarrollo de las plantas, como lo son el nitrógeno y el fósforo. En este sentido, se han reportado resultados diversos, por lo que la interacción entre la fitoacumulación de metales pesados y la absorción de nutrientes no sólo sería metal-específica sino también especie-específica (Hadad et al. 2007).

### *1.1 Objetivo*

Estudiar a través de ensayos estáticos de exposición a 96 horas: a) la remoción de cobre y nutrientes por *S. minima* en medio de cultivo y b) la remoción y compartimentalización de cobre por *S. minima* en agua del Río Pilcomayo, estimando las fracciones intra- y extracelular del metal en la biomasa.

## **2. Materiales y métodos**

### *2.1 Ensayo de remoción de cobre y nutrientes por S. minima en medio de cultivo*

### 2.1.1 Selección del medio de cultivo

El medio de cultivo seleccionado para los ensayos fue el medio Hutner 1/10 simplificado (Tabla 19). Dado que otros autores han reportado que la presencia del quelante EDTA en el medio de cultivo inhibe la remoción de plomo a concentraciones relativamente elevadas del metal (12 mg/L) (Olguín et al., 2005) y la remoción de cadmio (Srivasta y Appenroth, 1995), se realizó un ensayo preliminar de crecimiento de la especie (datos no mostrados) en medio de cultivo Hutner 1/10 con y sin el agregado de EDTA. Dado que el crecimiento no mostró diferencias significativas entre medios, se seleccionó el medio sin el agregado de EDTA para el desarrollo de los ensayos de remoción de cobre para evitar así un posible efecto del EDTA en la remoción del metal.

### 2.1.2 Desarrollo experimental

El crecimiento y la remoción de cobre y de nutrientes por *S. minima* se estudió en ensayos estáticos a 96 horas en los cuales los individuos de la especie se expusieron a distintas concentraciones del metal. Las plantas utilizadas provinieron de un monocultivo que se mantiene al aire libre en el parque del Museo Argentino de Ciencias Naturales *Bernardino Rivadavia*, por lo tanto, se trata de una población no expuesta a contaminantes. Una determinada biomasa se trasladó al invernáculo donde las plantas se aclimataron durante más de siete días en agua corriente de red a las condiciones de temperatura y humedad del ensayo.

Los ensayos se llevaron a cabo en invernáculo durante los meses de septiembre a noviembre del año 2008. Las temperaturas mínima y máxima promedio en el invernáculo durante dicho período fueron de 16,5 y 25,9 ° C, respectivamente. Las unidades experimentales consistieron en recipientes plásticos con un volumen de 1 L de medio de cultivo y plantas de *S. minima* de manera de totalizar 400 frondes (biomasa seca total=1,45 ± 0,08 gr). Se seleccionaron las plantas con mejor aspecto, es decir, aquellas con los frondes de un color verde intenso y se lavaron cuidadosamente con agua desionizada. El criterio para la determinación de los frondes se detalló previamente en el Capítulo 1 de esta Parte de las tesis. El diseño experimental consistió en ocho tratamientos y un grupo control, todos por triplicado. Las concentraciones de cobre

iniciales nominales de los tratamientos fueron: 0,1; 1; 2; 4; 6; 10; 50 y 100 mg Cu/L. Las concentraciones se obtuvieron a partir de una solución stock de 100 mg Cu/L. El reactivo utilizado para la solución stock fue CuCl<sub>2</sub> grado analítico. El control consistió en recipientes con el mismo número de frondes y medio de cultivo pero sin el agregado del metal. El pH del medio de cultivo fue ajustado a 6,5-7,5 y las plantas estuvieron expuestas al fotoperíodo natural del invernáculo en primavera (12:12, luz/oscuridad).

Diariamente se reubicó las bandejas al azar y se midió la temperatura, el pH y la conductividad. Al finalizar el ensayo se tomó una muestra del medio de cultivo para la determinación de la concentración de amonio, nitratos+nitritos, especies de fósforo reactivo solubles, sulfato y magnesio.

Las frondes (biomasa aérea) fueron separadas de las pseudoraíces y el rizoma (biomasa sumergida) y se determinó el peso seco de ambas biomásas. Luego, se procedió a la digestión ácida de dichas fracciones para determinar la concentración de cobre fitoacumulado por las plantas.

**Tabla 19.** Componentes del medio de cultivo Hutner 1/10 simplificado

	Concentración (mg/L)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	80
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	40
NaOH	40
MgSO <sub>4</sub>	40

Para estimar el peso seco inicial, se prepararon todas las unidades experimentales con el medio de cultivo y las 400 frondes correspondientes al ensayo y tres contenedores más. Luego, se extrajeron al azar tres contenedores, se separó la biomasa total en cada uno en biomasa aérea y biomasa sumergida, se determinó el peso seco de dichas biomásas, el peso seco total y se lo promedió. Éste peso seco promedio fue considerado como estimativo del peso seco inicial en todos los tratamientos.

Para evaluar la eficiencia de *S. minima* en la remoción de amonio, nitrato + nitrito, fósforo reactivo soluble, sulfato y magnesio, se calculó el porcentaje de remoción (%R) de cada nutriente de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\%R = 100 \times \left( 1 - \frac{C_f}{C_i} \right)$$

donde  $C_f$  y  $C_i$  corresponden a las concentración final e inicial de cada nutriente, respectivamente.

Como indicador de la capacidad de remoción de cobre por *S. minima*, en cada tratamiento se calculó el porcentaje del peso seco final de la biomasa correspondiente al cobre removido y el Factor de Bioconcentración (FBC):

$$FBC = \frac{\text{Metal en biomasa total (mg/kg biomasa seca)}}{\text{Concentración inicial de metal en solución (mg/L)}}$$

### 2.1.3 Análisis estadístico

Para determinar la existencia de diferencias significativas en el peso seco final, concentración de cobre en biomasa total, biomasa aérea y biomasa sumergida entre tratamientos, se aplicó análisis de varianza ANOVA de un factor. Previamente y para comprobar el cumplimiento de los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad, se aplicó el test de Levene y el de Kolmogorov-Smirnov (Test de Lilliefors). Cuando el supuesto de homocedacea no se cumplió aún con transformaciones, se aplicó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Estos análisis estadísticos se realizaron con el programa STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA). En los casos en los que el test de Kruskal-Wallis resultó significativo, se aplicó el test de comparaciones múltiples de Nemenyi (Zar, 1996).

### 2.2. Ensayo de remoción y compartimentalización de cobre por *S. minima* en agua del Río Pilcomayo

El crecimiento y la remoción de cobre por *S. minima* se estudió en un ensayo estático durante seis días en los que se expusieron individuos de la especie a distintas

concentraciones del metal en agua del Río Pilcomayo centrifugada y filtrada. Al igual que en el ensayo en medio de cultivo, las plantas utilizadas provinieron del monocultivo que se mantiene en el parque del MACN. Una determinada biomasa se trasladó al laboratorio donde las plantas se aclimataron en el agua experimental a las condiciones de temperatura y humedad durante 48 horas.

Tanto los recipientes utilizados, como la selección de plantas y criterio aplicado para la consideración de fronde son los mismos que se detallaron previamente (*sección 2.1*). En este caso, los recipientes contuvieron un volumen de 1 litro de agua del Río Pilcomayo y plantas de *S. minima* de manera de totalizar 300 frondes (biomasa seca total =1,188 gr). Las plantas estuvieron expuestas al fotoperíodo natural del laboratorio.

El diseño experimental consistió en siete tratamientos y un grupo control. Las concentraciones de cobre iniciales nominales fueron: 0,9; 2,4; 5,2; 10,5; 17,5; 21 y 28 mg Cu/L. La concentración de cobre disuelto en la unidad control fue de 0,001 mg/L. Las concentraciones se obtuvieron a partir de una solución stock de 100 mg Cu/L. El reactivo utilizado para la solución stock fue CuSO<sub>4</sub> grado analítico.

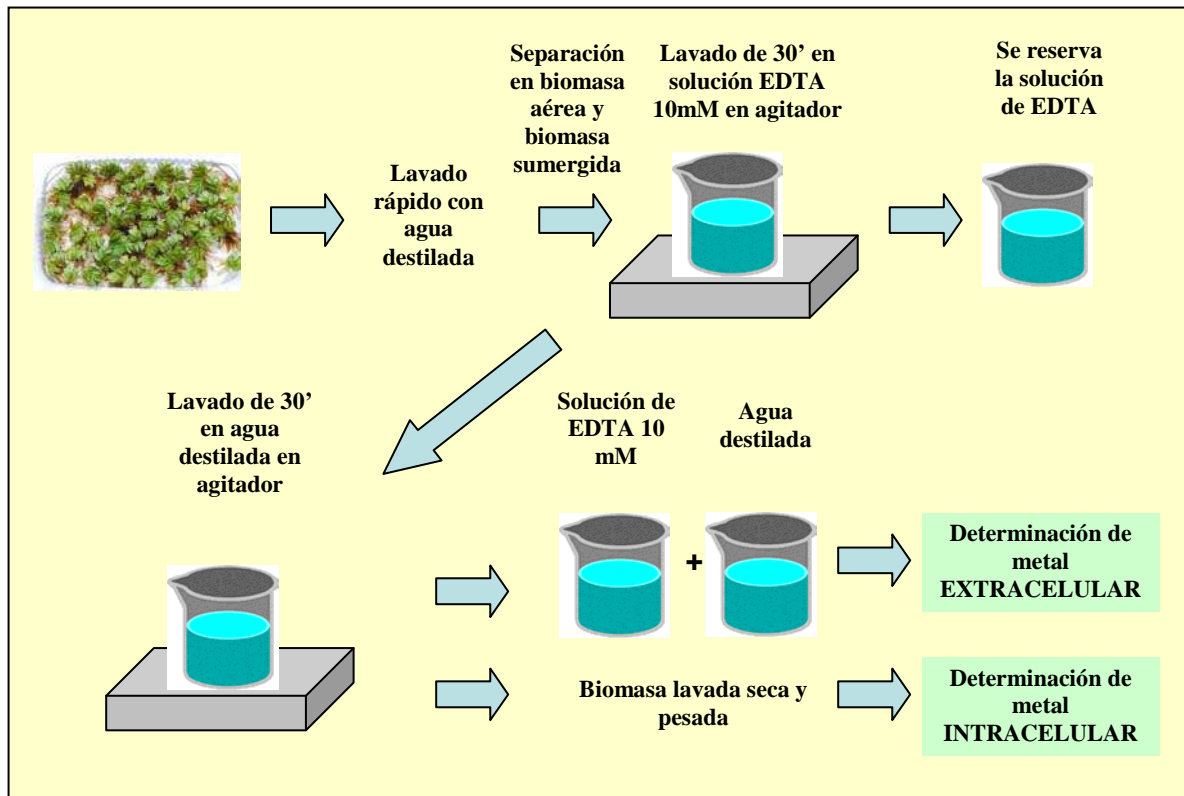
Luego del agregado del metal, inmediatamente, se tomó una muestra de agua que se acidificó a  $\text{pH} \leq 2$  con HNO<sub>3</sub> para la medición posterior del metal en solución. Diariamente se midió la temperatura, el pH y la conductividad. Al finalizar el ensayo se realizó el conteo de frondes. La biomasa total en cada unidad experimental se separó en biomasa aérea y biomasa sumergida. Luego del lavado con una solución de EDTA 10 mM y agua destilada (*Análisis de compartimentalización*), se determinó el peso seco de ambas biombras y se procedió a la digestión ácida para determinar la concentración de cobre bioacumulado en los tejidos, es decir, la fracción de cobre intracelular.

### 2.2.1 Análisis de compartimentalización

La metodología aplicada es la descrita por Noraho y Gaur (1998). Finalizado el ensayo, la biomasa de cada unidad experimental se lavó rápidamente con agua destilada para retirar posibles residuos. Seguidamente, las biombras aérea y sumergida se lavaron con 250 ml de una solución 10mM de EDTA durante 30 minutos en un agitador. Se reservó la solución de lavado. Luego, la biomasa lavada se colocó en un recipiente con 100 ml de agua destilada y nuevamente se agitó durante 30 minutos. Ambos lavados se



mezclaron en un mismo recipiente y se tomaron muestras que se acidificaron para determinar, previa digestión ácida, la fracción de metal extracelular. Un esquema del procedimiento llevado a cabo puede observarse en la Figura 29.



**Figura 29.** Esquema del procedimiento llevado a cabo para el análisis de compartimentalización del cobre en la biomasa de *S. minima*.

Siguiendo el estudio realizado por Sánchez-Galván y colaboradores (2008), quienes trabajaron ampliamente con la especie *S. minima*, se calcularon dos factores de remoción diferentes a partir de los datos de compartimentalización:

Factor de Bioadsorción (FBA):

$$FBA = \frac{\text{Metal adsorbido a la biomasa (mg/kg biomasa seca)}}{\text{Concentración inicial de metal en solución (mg/L)}}$$

Factor de Acumulación Intracelular (FAI):

$$FAI = \frac{\text{Metal acumulado intracelularmente (mg/kg biomasa seca)}}{\text{Concentración inicial de metal en solución (mg/L)}}$$

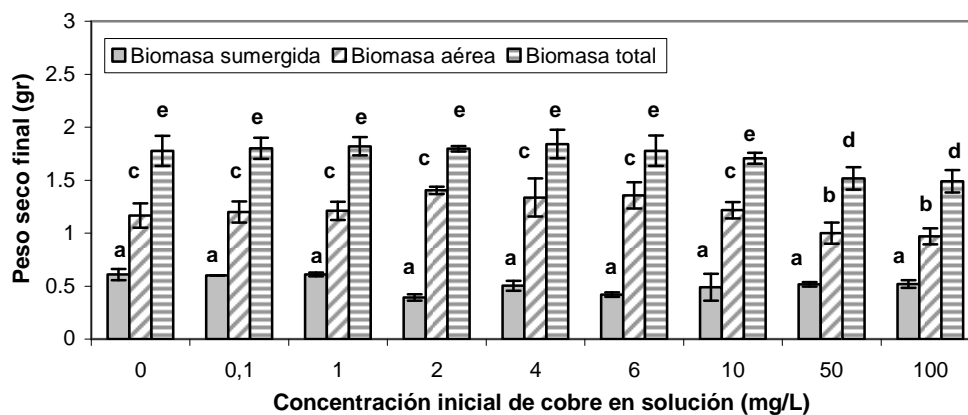
Asimismo, se calculó el porcentaje del peso seco total final de la biomasa correspondiente al cobre contenido en la misma.

### 3. Resultados

#### 3.1 Ensayo de remoción de cobre y nutrientes por *S. minima* en medio de cultivo

El pH promedio en los distintos tratamientos fue de  $7,13 \pm 0,5$  UpH. En el tratamiento de 10 mg Cu/L se registraron frondes cuyo color se tornó levemente marrón. En los tratamientos de 50 y 100 mg Cu/L se observaron frondes senescentes, es decir, frondes con un color marrón pálido que perdieron totalmente su turgencia. En el tratamiento de mayor concentración del metal (100 mg/L) todas las frondes presentaban dicha apariencia al finalizar el ensayo y las pseudoraíces se fragmentaban con facilidad.

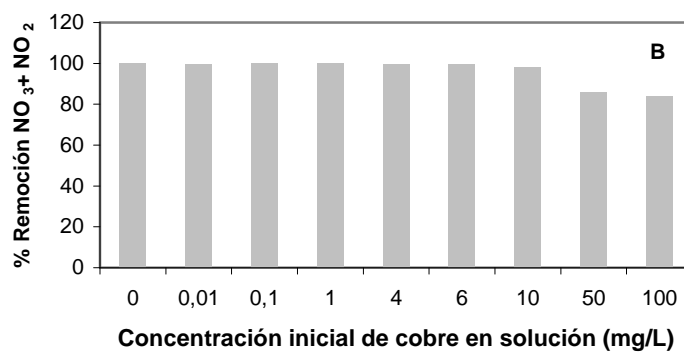
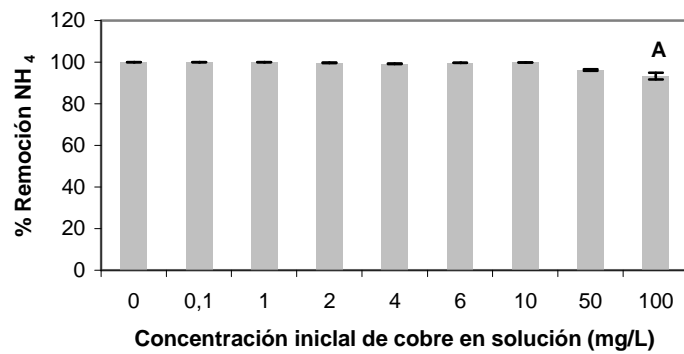
En cuanto al crecimiento, el peso seco final de la biomasa total fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) en los tratamientos de 50 y 100 mg Cu/L respecto al resto de los tratamientos, que no difirieron significativamente entre si (Figura 30).

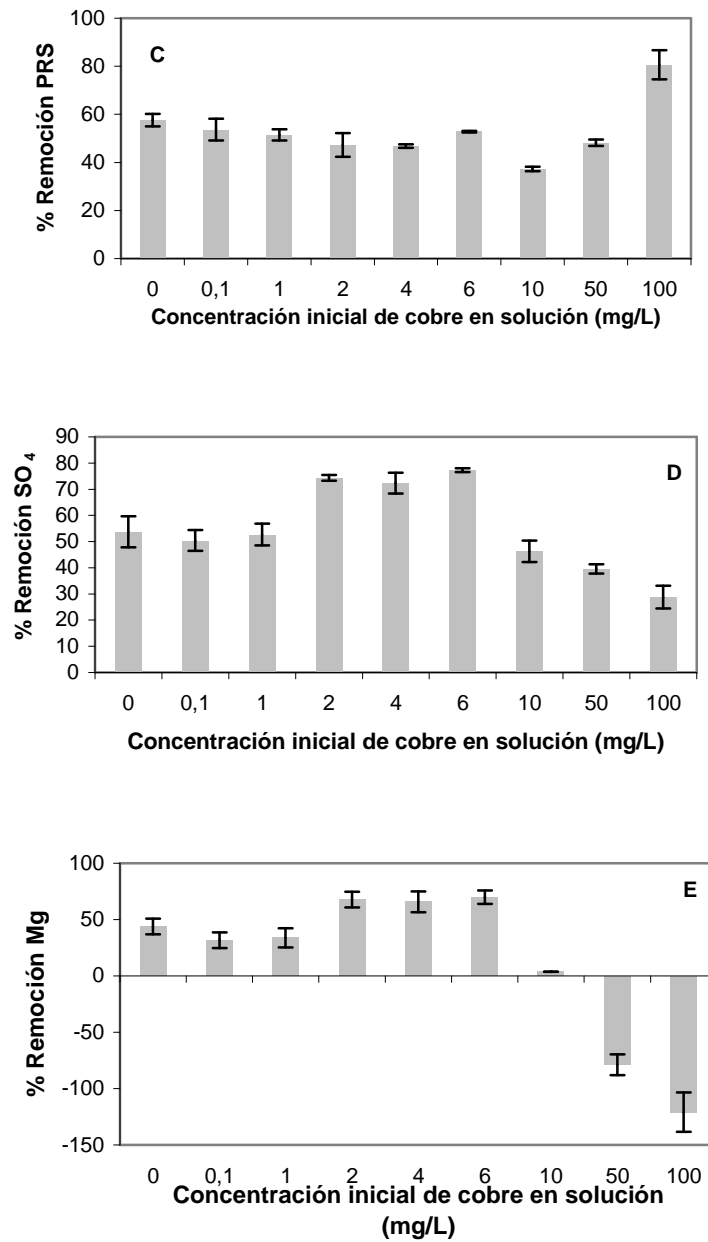


**Figura 30.** Biomasa final total, aérea y sumergida (gr) en función de la concentración inicial de cobre en solución. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

El menor peso de la biomasa total se debió al menor peso en la biomasa aérea ya que la biomasa sumergida no varió significativamente entre tratamientos ( $p>0,05$ ).

En la Figura 31 puede observarse el porcentaje de remoción de los nutrientes analizados en los distintos tratamientos. La disminución de la concentración de amonio en el agua (Figura 31, A) superó el 90 % en todos los tratamientos. En los tratamientos con las concentraciones de cobre más elevadas, la remoción disminuyó levemente respecto del resto de las concentraciones. Por su parte, la remoción de nitratos y nitritos mostró una disminución de la concentración cercana al 100% en todos los tratamientos excepto los tratamientos de 50 y 100 mg Cu/L en los que la disminución se redujo (Figura 31, B).





**Figura 31.** Remoción (%) de amonio (A), nitratos y nitritos (B), fósforo reactivo soluble (C), sulfatos (D) y magnesio (E) en función de la concentración inicial de cobre en solución.

La remoción de especies de fósforo solubles (Figura 31, C) fue inferior a la de las especies nitrogenadas, encontrándose en el rango de 40 a 60 % de remoción hasta los 50 mg Cu/L en solución. En el tratamiento de mayor concentración de cobre, la remoción fue superior, alcanzando el 80,6 %.

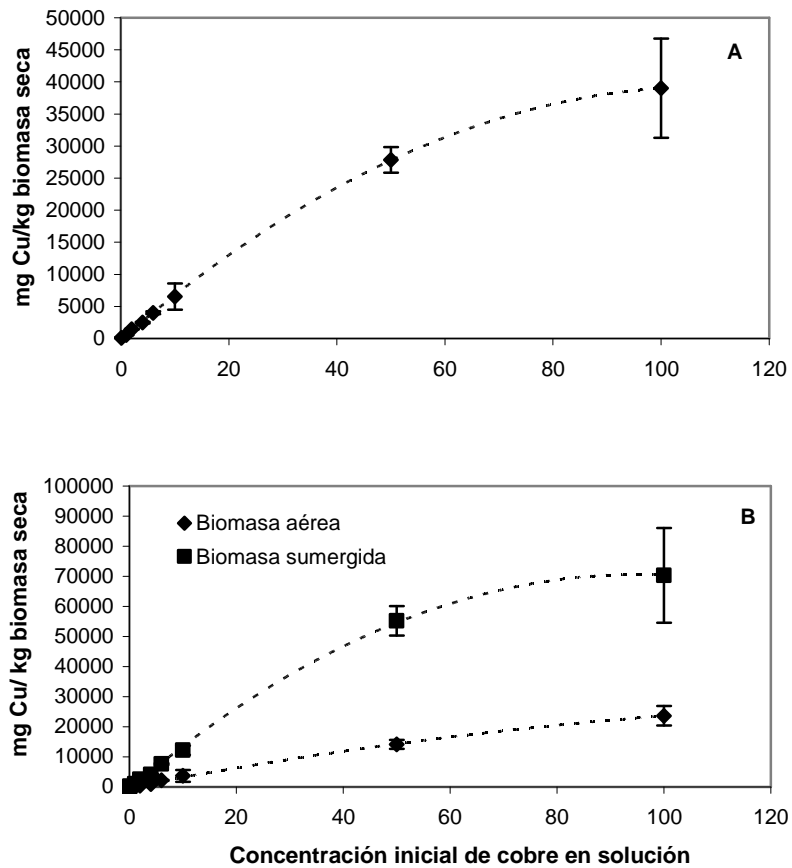
La remoción de sulfatos (Figura 31, D) se mantuvo constante en el rango de 0 a 0,1 mg Cu/L, luego se incrementó para alcanzar un valor de entre 70 y 80 % en los

tratamientos de 2 a 6 mg Cu/L y luego mostró una disminución, hasta alcanzar el mínimo en el tratamiento de 100 mg Cu/L (28,7 %). Por último, la remoción de magnesio (Figura 31, E) se mantuvo prácticamente igual entre 0 y 1 mg Cu/L, luego se incrementó en el tratamiento de 2 mg/L para mantenerse hasta el tratamiento de 10 mg/L en el que disminuyó a 3,60 %. En las concentraciones más elevadas de cobre, la concentración final de magnesio superó a la inicial (porcentaje de remoción negativo).

El análisis estadístico de la concentración de cobre en biomasa total (mg Cu/kg) y en biomasa aérea y sumergida no cumplió con el supuesto de homogeneidad de varianzas, por lo tanto, se realizó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis. De acuerdo al análisis estadístico, existieron diferencias significativas entre tratamientos en la concentración de cobre en la biomasa total ( $H_{(7, n=24)} = 22,69, p = 0,0019$ ), en biomasa aérea ( $H_{(7, n=24)} = 22,21, p = 0,0023$ ), y en biomasa sumergida ( $H_{(7, n=24)} = 22,58, p = 0,0020$ ). Dado que el test de comparaciones múltiples de Nemenyi, no logró mostrar qué tratamientos diferían entre si, se optó por graficar los datos y ajustarlos a una función que mejor los explique.

La concentración de cobre en la biomasa total, biomasa aérea y sumergida se incrementó con la concentración de cobre inicial en solución. La concentración de cobre en la biomasa total en función de la concentración inicial del metal en solución (Figura 32 A), se ajustó a una función polinómica de grado dos ( $y = -3,3312x^2 + 725,27x - 179,25$ ) con un  $R^2$  de 0,9999. La concentración de cobre en biomasa aérea y sumergida (Figura 32 B) también se ajustaron a funciones polinómicas de grado dos ( $y = -1,0081x^2 + 337,62x - 46,608$  e  $y = -7,8789x^2 + 1499,7x - 714,26$ ) con un  $R^2$  de 0,9991 y 0,9992; respectivamente. Como puede observarse en la Figura 32, el cobre fitoacumulado en la biomasa sumergida fue mayor al fitoacumulado en biomasa aérea para todos los tratamientos.

Por último, la Tabla 20 muestra el % del peso seco de la biomasa final correspondiente a cobre y el FBC calculados para cada tratamiento. Como puede observarse, el porcentaje de cobre en la biomasa superó el 0,5 %, a partir del tratamiento de 10 mg/L, llegando a casi el 4 % en el tratamiento de mayor concentración del metal en solución. El FBC mostró un patrón inverso, disminuyendo su valor a mayor concentración de cobre en solución.



**Figura 32.** Concentración de cobre (mg Cu/kg biomasa seca) en las plantas en función de la concentración inicial de cobre en solución, en biomasa total (A) y en biomasa aérea y sumergida (B).

**Tabla 20.** Porcentaje del peso seco total en cobre y Factor de Bioconcentración (FBC) calculados para cada tratamiento.

Tratamiento (mg/L)	% peso seco en Cu	FBC
0,1	$0,008 \pm 0,0005$	$824,45 \pm 58,4$
1	$0,05 \pm 0,004$	$526,73 \pm 43,7$
2	$0,14 \pm 0,006$	$726,40 \pm 31,4$
4	$0,25 \pm 0,01$	$620,63 \pm 28,8$
6	$0,4 \pm 0,02$	$666,66 \pm 38,5$
10	$0,65 \pm 0,2$	$653,33 \pm 202,7$
50	$2,78 \pm 0,2$	$557,11 \pm 40,1$
100	$3,90 \pm 0,77$	$390,12 \pm 77,4$

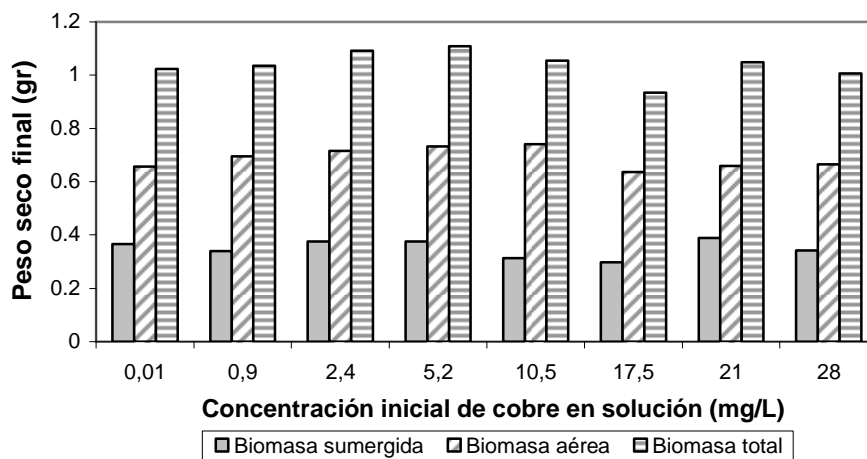
3.2 Ensayo de remoción y compartimentalización de cobre por *S. minima* en agua del Pilcomayo

Los principales parámetros físico-químicos del agua colectada en el Río Pilcomayo aparecen en la Tabla 8 (Parte II, Capítulo 1).

Esta agua se caracterizó por una elevada dureza y alta concentración de sulfatos y cloruros, principalmente. Dado que el agua del Río Pilcomayo se caracteriza también por la elevada carga de sólidos en suspensión, se centrifugó y filtró para evitar la adsorción del metal a dichos sólidos.

La temperatura y pH promedios del agua del ensayo fueron de  $18,5 \pm 1,2$  °C y  $8,09 \pm 0,22$  UpH, respectivamente. Durante las primeras horas del ensayo se evidenció un cambio de color en el agua de los tratamientos de 10,5 a 28 mg Cu/L, la cual se tornó azulada, evidencia de metal en suspensión. La apariencia general de las plantas fue buena durante todo el ensayo y no se registraron diferencias observables entre las distintas concentraciones de cobre en solución.

Dado que los tratamientos no han contado con réplicas fue imposible realizar un análisis estadístico de los resultados, pero puede observarse en la Figura 33 que, aparentemente, no se registraron diferencias en el crecimiento entre tratamientos.



**Figura 33.** Biomasa final total, aérea y sumergida (gr) en función de la concentración inicial de cobre en solución.

La Figura 34 muestra el contenido de cobre total en la biomasa total y las biombras aérea y sumergida (Figura 34 A) y la distinción entre fracciones extra- (Figura

34 B) e intracelular (Figura 34 C) del cobre removido en ambos tipos de biomasa. Como puede observarse, la concentración de cobre en la biomasa total y las dos fracciones del metal se incrementaron conforme aumentó la concentración inicial de cobre en solución.

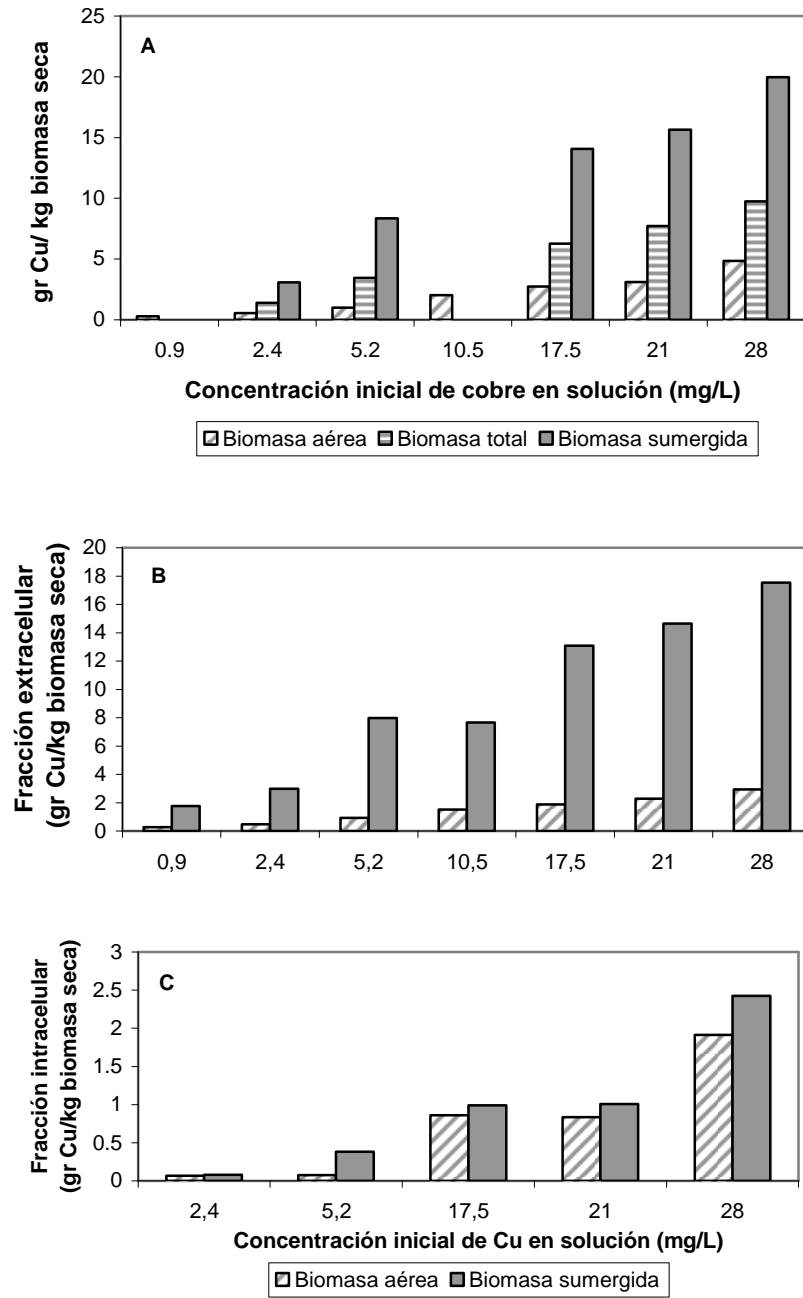
En cuanto al análisis de compartimentalización, *S. minima* removió el metal en todos los tratamientos, fundamentalmente, por biosorción. Así lo muestra la Figura 34 B y C donde puede observarse por comparación de los valores de cada fracción, que este mecanismo de remoción fue el predominante tanto en la biomasa aérea como en la sumergida y, por último, otro parámetro que mostró la remoción diferencial fue el FBA. La Tabla 21 permite observar la magnitud de la diferencia entre el factor de bioadsorción (FBA), cuyos valores estuvieron en el rango de 281,9-845,3, y el de acumulación intracelular (FAI), con valores de entre 26,9 y 66,5.

Como puede observarse en la Figura 34 B y C, tanto la fracción de cobre intracelular como la extracelular tendieron a incrementarse, tanto en la biomasa aérea como en la sumergida, a mayor concentración inicial de cobre en solución. Sin embargo, el incremento fue mayor en la fracción extracelular.

El FBA mostró una tendencia decreciente con el aumento del metal en solución (Tabla 21). A partir del tratamiento de 10,5 mg Cu/L, el valor del FBA se mantuvo prácticamente constante. Por otra parte, el FAI mostró un leve incremento a mayor concentración de cobre en solución.

En la Tabla 21 puede observarse asimismo el porcentaje del peso seco en cobre y el FBC calculados para cada tratamiento. La contribución del cobre en el peso seco final de la biomasa se incrementó con la concentración inicial de cobre en solución. Si bien no fue posible calcular el FBC para el tratamiento de 10,5 mg Cu/L puede considerarse que su valor sería muy similar al del FBA, por lo tanto, el FBC mostró una disminución para mantenerse prácticamente constante a partir del tratamiento de 10,5 mg Cu/L.





**Figura 34.** Concentración de cobre total (gr Cu/kg biomasa seca) en biomasa total, biomasa aérea y sumergida (A), en el compartimento extracelular (B) y en el compartimento intracelular (C) de biomasa aérea y sumergida.

**Tabla 21.** Porcentaje del peso seco final en cobre, Factor de Bioconcentración (FBC), Factor de Bioadsorción (FBA) y Factor de acumulación intracelular (FAI) calculados para cada tratamiento.

Tratamiento (mg/L)	% del peso seco en Cu	FBC	FBA	FAI
0,9	-	-	845,32	-
2,4	0,14	585,04	558,13	26,90
5,2	0,34	666,01	637,72	28,28
10,5	-	-	318,39	-
17,5	0,62	357,79	311,92	45,87
21	0,77	367,94	327,06	40,88
28	0,97	348,48	281,98	66,50

### 3.3 Comparación entre ensayos

Para el rango de concentraciones de cobre comunes en ambos ensayo, entre 2 y 10 mg Cu/L, el valor del factor fue levemente superior en medio de cultivo Hutner.

En cuanto al porcentaje de cobre en el peso seco de la biomasa, hasta el tratamiento de 6 mg/L, el porcentaje fue similar entre ensayos. En ambos casos se observa una tendencia de incremento, siendo este mucho mayor en el ensayo en medio de cultivo Hutner, ya que en este medio, el porcentaje alcanzó el 0,6 % en el tratamiento de 10 mg Cu/L, en cambio, en agua del Río Pilcomayo, el porcentaje alcanzó ese valor en el tratamiento de 17,5 mg Cu/L.

## 4. Discusión

### 4.1 Remoción de nutrientes

Muchos efluentes contienen no sólo altos niveles de nitrógeno y fósforo, sino también elevadas concentraciones de metales. Por esta razón resulta importante analizar la eficiencia de la remoción de nutrientes en presencia de distintos niveles de metales.

La remoción de las especies fuente de nitrógeno (amonio y nitratos + nitritos) fue muy importante en todos los tratamientos, alcanzando más del 90 %. En este sentido, la gran reducción de nitrógeno en el agua no sólo puede deberse a la absorción por las plantas sino también a la actividad del biofilm adherido a las pseudoraíces y envés de las frondes (Körner y Vermaat, 1998). Reddy et al. (1990) observaron un

incremento en la concentración de oxígeno en la rizósfera de plantas flotantes durante el tratamiento de efluentes domésticos, que podría favorecer la nitrificación. La posterior denitrificación en un ambiente con bajos tenores de oxígeno explicaría en parte la disminución del observada. Asimismo, Körner y Vermaat (1998) reportaron que en un sistema de remediación de efluentes domésticos cubierto con la especie *L. gibba*, el efecto de la nitrificación/denitrificación en la pérdida de nitrógeno total era comparable a la remoción ejercida por la propia especie. Por otro lado, y como se ha expuesto en el Capítulo 1, *S. minima* presenta un consumo luxuriante de nitrógeno. En el caso del amonio, la eficiencia en la remoción por *S. minima* fue similar a la reportada para *L. gibba* por El Shafai et al. (2007). Asimismo, Sooknah y Wilkie (2004) encontraron una remoción del 99,6 % de amonio en experiencias de 30 días de duración con *Eicchornia crassipes*. Por lo tanto, la remoción registrada en esta contribución fue muy alta ya que fue semejante y la duración del ensayo fue muy inferior (4 días). Por otro lado, en los tratamientos con las dos concentraciones de cobre más elevadas ( $\geq 50$  mg Cu/L), la disminución de nitratos + nitritos se redujo, en acuerdo con la disminución en el crecimiento registrada, síntoma de la toxicidad en estos altos niveles del metal.

La remoción del fósforo en su fracción disuelta (PRS) fue menor que la remoción de las especies de nitrógeno y mostró una tendencia a la disminución con el aumento en la concentración de cobre en solución, excepto en el tratamiento de mayor concentración, donde la remoción se incrementó para alcanzar el mayor valor. Otros autores hallaron una disminución del contenido de fósforo soluble semejante en ensayos de una duración similar a la del en sayo de la presente contribución (Reddy et al., 1986; Huett et al., 2005). Los compuestos inorgánicos de fósforo no sólo pueden ser absorbidos por las plantas y el biofilm sino que también pueden precipitar y sedimentar y adsorberse a las raíces. Por lo tanto, el aumento en la remoción de fósforo en el tratamiento con mayor contenido de cobre, podría estar asociado a la adsorción y/o precipitación del los compuestos de fósforo en el material desprendido de las pseudoraíces ó a la adsorción a nuevos sitios expuestos en la biomasa senescente.

La remoción de sulfatos mostró un patrón bien definido, aumentando en las concentraciones intermedias de cobre y luego disminuyendo para alcanzar un mínimo en el tratamiento de mayor concentración del metal. Este patrón estaría reflejando que, a

concentraciones intermedias de cobre, las plantas son más eficientes en la remoción de sulfatos, a menores concentraciones esa eficiencia disminuye por carencia de cobre como micronutriente y a mayores concentraciones disminuye probablemente por toxicidad de elevados niveles del metal produciendo inhibición en la remoción de sulfatos.

La remoción de magnesio en general fue menor que para los otros nutrientes estudiados. Mostró un aumento a concentraciones intermedias de cobre en solución y en las concentraciones más elevadas de cobre, la concentración final de magnesio superó a la concentración inicial, es decir, se produjo la liberación del ion desde las plantas. Al respecto, Shilla et al. (2006) reportaron liberación de magnesio durante la descomposición de macrófitas en ambientes naturales. Dado que en el ensayo, las plantas parecían senescentes en las dos concentraciones donde se verificó la liberación de magnesio, posiblemente, esta liberación se debió a la incipiente descomposición del material vegetal ó a la lixiviación de magnesio del material desprendido en estas dos concentraciones de cobre.

#### 4.2 Remoción de cobre

Si bien el cobre constituye un micronutriente esencial para las plantas, en exceso puede tener efectos tóxicos. Uno de los primeros efectos es la reducción en el crecimiento (Hagemeyer, 1999). En la presente contribución, en medio de cultivo Hutner 1/10, el crecimiento de *S. minima* se redujo únicamente en los tratamientos con las concentraciones de cobre más elevadas. En estos casos, el efecto tóxico del metal fue evidente ya que a las 24 horas de iniciado el ensayo las plantas tomaron un color marrón pálido y, a simple vista, parecían senescentes. Estos síntomas de toxicidad también han sido reportados previamente por Xing et al. (2010) en *Spirodela polyrrhiza*, en un ensayo de bioacumulación de cobre cuando individuos de la especie fueron expuestos a una concentración de 100 mg Cu/L. Por otra parte, en agua del Río Pilcomayo, *S. minima* no presentó un crecimiento diferencial entre tratamientos.

Las plantas presentan diversas estrategias para tolerar elevadas concentraciones de metales en el agua. En este trabajo se observó que, en ambos medios de cultivo, la remoción de cobre por *S. minima* se incrementó con la concentración del metal en

solución. Esto indica que la especie fitoacumula el metal en solución. En el ensayo en medio Hutner 1/10, el mayor contenido de cobre en la biomasa se observó en el tratamiento de mayor concentración. Xing et al. (2010) también observaron el máximo de remoción para *L. gibba* en un tratamiento donde la especie fue expuesta a 100 mg Cu/L. Para esta especie, estos autores reportaron un máximo de 10,14 mg Cu/gr biomasa seca en una exposición de 24 horas. En *S. minima*, la remoción observada para el tratamiento de mayor concentración de cobre en solución fue cuatro veces superior (39,01 mg Cu/gr biomasa seca) al finalizar el ensayo de 96 horas. Si *L. gibba* puede cuadruplicar la remoción en una exposición de 96 horas, ambas especies tendrían una eficiencia similar.

Existe en la bibliografía un trabajo previo de remoción de cobre por *S. minima*. Al-Handami y Blair (2004) analizaron la remoción del metal por esta especie en un rango de concentraciones de 0,06 a 3 mg/L y reportaron, para un ensayo de 7 días de exposición, una remoción de 3,5 gr Cu/kg biomasa seca. En el presente trabajo, en ambos medios de cultivo estudiados y para el mismo rango de concentraciones, la especie presentó una remoción superior similar. También fue posible determinar que la remoción de cobre fue muy superior en la biomasa sumergida respecto de la biomasa aérea, tanto en medio Hutner 1/10 como en agua del Río Pilcomayo. Esto mismo ha sido observado por otros autores que han trabajado con plantas flotantes. Maine et al. (2004) han informado una mayor remoción de cromo en biomasa sumergida de *Salvinia herzogii* y de cadmio en *Pistia stratiotes* (Maine et al., 2001). Esta remoción diferencial se debe, probablemente, a la mayor superficie de contacto de la biomasa sumergida con el metal en solución y a la baja traslocación del metal desde la biomasa sumergida a la biomasa aérea. Es decir, habría una protección de la maquinaria fotosintética.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio de compartimentalización en agua del Río Pilcomayo, tanto la fracción extracelular como la intracelular del metal removido, se incrementaron con la concentración del metal en solución. Por otro lado, también se observó que la remoción en el compartimento extracelular fue superior a la bioacumulación. Sánchez-Galván et al. (2008) hallaron que *S. minima* removió un gran porcentaje de plomo en solución por el mismo mecanismo. En *Azolla pinnata* y *Spirodela polyrhiza* (Noraho y Gaur, 1998) y en varias especies de briofitas (Mouvet y

Claveri, 1999; Vázquez et al., 1999), también se ha demostrado que la adsorción es el principal mecanismo de remoción de metales pesados en solución. Desde los comienzos del estudio de la fitoacumulación y compartimentalización de metales en plantas, varios autores han atribuido la capacidad de las distintas especies de remover metales por adsorción a las características químicas superficiales de las especies y a la superficie específica de las mismas, es decir, las especies con una gran capacidad para remover metales pesados en solución tendrían membranas ó paredes celulares con abundantes grupos carboxilo, sulfidrilo, amino y fosfato y una gran superficie específica posibilitando una mayor biosorción de los metales (Bates et al., 1982). De acuerdo a Vegliò y Beolchini (1997), la adsorción y complejación entre el metal y los grupos amino y carboxilo de los polisacáridos que conforman la pared celular serían los mecanismos responsables de la acumulación de cobre en solución por el alga *Chlorella vulgaris*. Según Sánchez-Galván et al. (2008), *S. minima* posee una gran superficie específica (264 m<sup>2</sup>/gr) y su biomasa es rica en carbohidratos (48,50 %) y en grupos carboxilo (0,95 mmol/gr). Estas características de la especie serían las responsables de su gran capacidad para remover metales pesados en solución a través de la biosorción.

Cabe destacar que en ambos ensayos se observó la precipitación del metal. Por ende, las plantas probablemente estuvieron en contacto con una mayor concentración del metal en solución durante los primeros minutos-horas del ensayo. En este sentido, estudios sobre la cinética de la remoción de metales por plantas acuáticas han demostrado una fase inicial de rápida remoción seguida por una fase lineal más lenta. Se ha sugerido que la fase inicial representa el proceso rápido y reversible de adsorción del metal, mientras la fase más lenta que le sigue estaría gobernada por el transporte del metal a través de la membrana plasmática hacia el citoplasma (bioacumulación) (Vegliò y Beolchini, 1997). En acuerdo con estos estudios, Olguín et al. (2002, 2005) observaron que *S. minima* removió el 55 % del plomo y el 60 % del cadmio durante las primeras 4 a 6 horas del ensayo. Sen y Mondal (1990), asimismo, observaron que *S. natans* removió más del 90 % del cobre inicial en solución durante las primeras 24 horas de exposición.

Para determinar si una especie es hiperacumuladora, en adición a los criterios propuestos por Zayed et al. (1998) y expuestos en la introducción del presente capítulo,

Prasad y de Oliveira Freitas (2003) citan un criterio diferencial de acuerdo al metal; de forma tal que una especie sería hiperacumuladora de cobre si el porcentaje de su peso seco en cobre es  $\geq 0,1$  %. De acuerdo con este criterio, *S. minima* sería hiperacumuladora de cobre a partir de una concentración inicial de 2 mg Cu/L en solución. Por otra parte, siguiendo los criterios expuestos por Zayed et al. (1998), Olgún et al. (2002, 2005) han reportado que *S. minima* sería hiperacumuladora de cadmio (1,1 % biomasa seca, FBC=2694). Por otra parte, estos autores informaron que la especie removi6 un gran porcentaje de plomo (FBC=3304), no así de cromo (FBC=784). Los resultados obtenidos en la presente contribución en ambos medios de cultivo indican que *S. minima*, en las condiciones experimentales, no sería hiperacumuladora de cobre ya que en ningún tratamiento el FBC fue superior a 1000 y el peso seco en cobre superior a 0,5 % simultáneamente, sin embargo, el porcentaje del peso seco en cobre super6 el 0,5 % a mayor concentración del metal en solución. Por lo tanto, *S. minima* sería una especie eficiente en la remoción de cobre ya que aún no registrándose un incremento en la biomasa, aument6 la remoción a mayor concentración del metal en solución. Y cabe destacar que la diferenciación del FBC en un factor de bioadsorción (FBA) y en un factor de acumulación intracelular (FAI) permiti6 observar que la remoción se debió, casi por completo, como se expres6 anteriormente, a biosorción.

La eficiencia de las plantas en la remoción de metales pesados puede estar afectada por varios factores tanto de tipo ambiental (temperatura, fotoperíodo) como por las características químicas del medio, sea agua ó tierra, en el que se encuentran. El medio de cultivo Hutner 1/10 simplificado, es un medio con algunos de los principales macronutrientes requeridos por las plantas (nitr6geno, f6sforo, azufre, magnesio). El agua del Río Pilcomayo, por su parte, se caracteriza por un menor contenido de nitr6geno y f6sforo (nitr6geno inorgánico disuelto=13,85 mg/L) respecto del medio Hutner 1/10, pero presenta concentraciones superiores de calcio y magnesio; y micronutrientes esenciales como cobre y cinc. A pesar de estas diferencias, los resultados indicaron que hasta los 10 mg Cu/L, aproximadamente, *S. minima* present6 una remoción similar entre ensayos, por lo tanto, hasta dicha concentración las diferencias en contenido y concentración de nutrientes, pH y demás condiciones

experimentales parecen no haber influido en la capacidad de remoción de cobre por *S. minima*.



## **Capítulo 3.**

### **Remoción de cinc por *Salvinia minima***

#### **1. Introducción**

El cinc es un micronutriente esencial que juega un papel vital en el metabolismo de las plantas. El cinc participa en el mantenimiento de la función y estructura de las membranas y se encuentra presente en varias enzimas. El cinc participa en la transcripción y protege al ADN y las membranas de daños que pueden causar las especies reactivas de oxígeno (ERO). La suplementación con cinc protege a las plantas del estrés oxidativo inducido por otros metales pesados (Wang et al., 2009).

Por otra parte, elevados niveles de cinc pueden ser tóxicos para las plantas. El estrés por exceso de cinc reduce el crecimiento de las raíces, disminuye el contenido de clorofila e incluso genera clorosis. Asimismo, no sólo tiene efectos negativos sobre la permeabilidad de las membranas, la cadena de transporte de electrones y la absorción y traslocación de nutrientes sino que también induce la acumulación de poliamina, prolina y otros aminoácidos. Estudios recientes han demostrado que niveles tóxicos de cinc incrementan la generación de (EROs), causan peroxidación lipídica y alteran el funcionamiento de varias enzimas antioxidantes en plantas terrestres y en organismos acuáticos como las algas y en macrófitas flotantes como las lemnáceas (Wang et al. 2009).

Así como para otros metales pesados, varias especies de macrófitas flotantes han demostrado, una gran capacidad para tolerar y bioacumular altos niveles de cinc. Tanto para las especies *L. gibba* (Khellaf y Zerdaoui, 2009), *Azolla caroliniana* (Deval et al. 2012) y *Eichornia crassipes* (Lu et al., 2004) se ha informado una remoción de cinc superior a los 1000 mg Zn/kg biomasa seca. Por otro lado, Wang et al. (2009) han informado que el estrés por elevados niveles de cinc produjo desbalance nutricional y daño oxidativo en la especie acuática sumergida *Hydrilla verticillata*.

### 1.1 Objetivo

Estudiar la remoción de cinc por la especie flotante *S. minima*.

## 2. Materiales y métodos

El crecimiento y la remoción de cinc por *S. minima* se estudió en un ensayo estático durante 96 horas en las que se expusieron individuos de la especie a distintas concentraciones del metal en agua del Río Pilcomayo centrifugada y filtrada. La Tabla 8 (Parte II, Capítulo 1) muestra los principales parámetros físico-químicos del agua experimental. Al igual que en los ensayos descritos en capítulos anteriores, las plantas utilizadas provinieron del monocultivo que se mantiene en el parque del MACN y una determinada biomasa se trasladó al laboratorio donde las plantas se aclimataron en el agua experimental a las condiciones de temperatura y humedad durante 48 horas.

Tanto los recipientes utilizados, como la selección de plantas y criterio aplicado para la consideración de fronde son los mismos que se han detallado en el Capítulo 2 de esta Parte de la tesis. En este caso, los recipientes contuvieron un volumen de 1/2 litro de agua del Río Pilcomayo y plantas de *S. minima* de manera de totalizar 400 frondes (biomasa seca total=1,3341 ± 0,1581 gr). Las plantas estuvieron expuestas al fotoperíodo natural del laboratorio (12:12, luz/oscuridad).

El diseño experimental consistió en cuatro tratamientos y un grupo control por triplicado. Las concentraciones de cinc iniciales nominales fueron: 5, 10, 20 y 40 mg Zn/L. El control consistió en recipientes con el mismo número de frondes en el agua experimental pero sin el agregado del metal. Las concentraciones se obtuvieron a partir de una solución stock de 100 mg Zn/L. El reactivo utilizado para la solución stock fue ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O grado analítico.

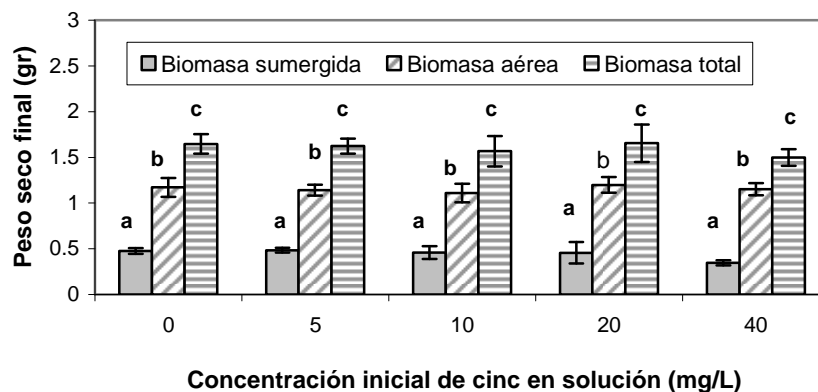
Diariamente se midió temperatura, pH y conductividad. Al finalizar el ensayo se realizó el conteo de frondes. La biomasa total en cada unidad experimental se separó en biomasa aérea y biomasa sumergida. Se determinó el peso seco de ambas biomásas y se procedió a la digestión ácida para determinar posteriormente la concentración de cinc en las mismas.

Se calculó el Factor de Bioconcentración (FBC), según la fórmula detallada en el Capítulo II de la presente Parte de la tesis y el porcentaje del peso seco final correspondiente al metal removido.

Se aplicó análisis de varianza ANOVA de un factor, previa comprobación del cumplimiento de los supuestos de normalidad (test de Lilliefors) y homogeneidad de varianzas (test de Levene), para determinar diferencias significativas en el peso seco de la biomasa final total y de la biomasa aérea y sumergida, en el contenido de cobre en biomasa aérea y sumergida, en el FBC y en el porcentaje de peso seco en cobre entre tratamientos. Este análisis estadístico se realizó con el programa STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA).

### 3. Resultados

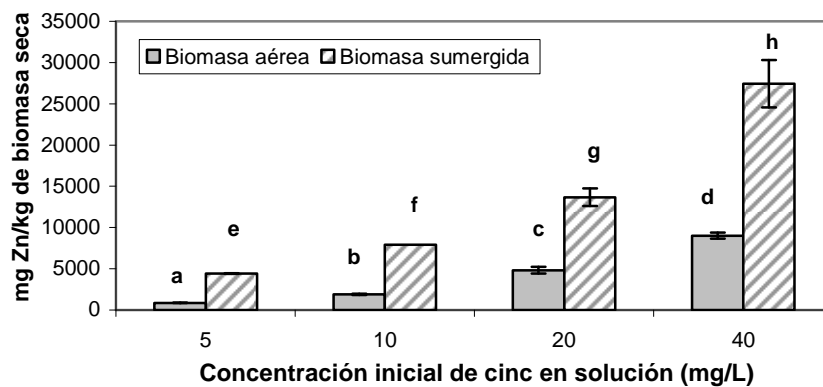
El pH y temperatura promedios del ensayo fueron de  $7,80 \pm 0,27$  UpH y  $21,9 \pm 2,2$  °C, respectivamente. En todos los tratamientos las plantas conservaron buena apariencia general. El peso seco de la biomasa total final y de las biomásas aérea y sumergida no mostraron diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ ) (Figura 35).



**Figura 35.** Biomasa final total, aérea y sumergida (gr) en función de la concentración inicial de cinc en solución. Letras diferentes indican diferencias significativas.

La concentración de cinc en las biomásas aérea y sumergida puede observarse en la Figura 36. El metal contenido en ambas biomásas aumentó significativamente

( $p < 0,05$ ) con el incremento de la concentración del metal en solución y la remoción fue significativamente superior ( $p < 0,05$ ) en biomasa sumergida respecto de la biomasa aérea en todos los tratamientos. El porcentaje del peso seco en cinc mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) (Tabla 22), aumentando conforme se incrementó la concentración de metal en solución. Por el contrario, el FBC (Tabla 22) no mostró diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ ).



**Figura 36.** Concentración de cinc (mg Zn/kg biomasa seca) en las plantas en función de la concentración inicial de cinc en solución, en biomasa aérea y sumergida.

**Tabla 22.** Porcentaje de peso seco en cinc y Factor de Bioconcentración (FBC) para cada tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Tratamientos (mg/L)	% del peso seco en Zn	FBC
5	0,19	391,36
10	0,36 ± 0,05 <b>a</b>	364,71 ± 53,65 <b>a</b>
20	0,70 ± 0,07 <b>b</b>	368,14 ± 24,2 <b>a</b>
40	1,33 ± 0,08 <b>c</b>	332,02 ± 19,04 <b>a</b>

#### 4. Discusión

El crecimiento es una de las primeras variables que muestra el efecto tóxico de los metales pesados en las plantas. En la presente contribución, *S. minima* no mostró variaciones en la biomasa seca final entre tratamientos y respecto al control. En este sentido, Jain et al. (1990) informaron que la adición de cinc en bajas concentraciones

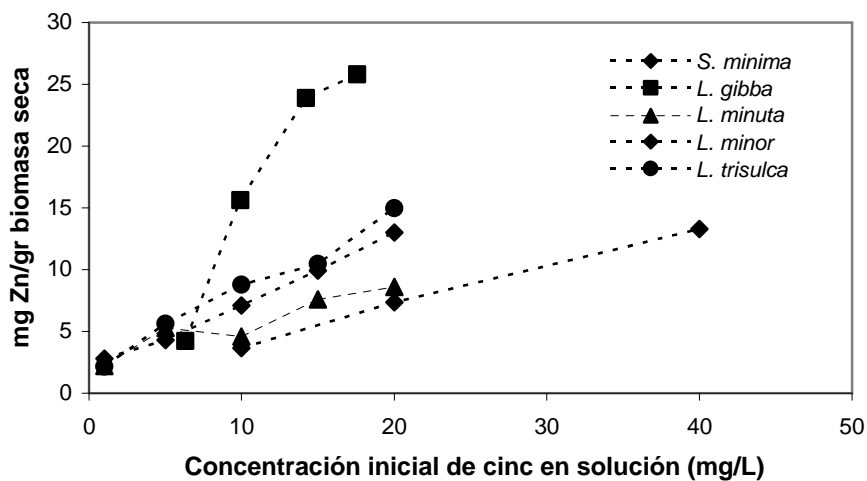
tuvo un efecto favorable en el crecimiento de *E. crassipes*. Asimismo, Deval et al. (2012) observaron un incremento en la biomasa seca de *A. caroliniana* que los autores atribuyeron a la bioacumulación del metal. En un ensayo de remoción de cadmio y cinc, Lu et al. (2004) informaron que el crecimiento relativo de *E. crassipes* se incrementó significativamente en tratamientos en los que las plantas fueron expuestas a concentraciones de 5 y 10 mg Zn/L pero disminuyó en tratamientos de 20 y 40 mg/L. Dado que en el presente trabajo *S. minima* fue expuesta a concentraciones similares y no mostró síntomas visibles de toxicidad ni variaciones en el crecimiento, es posible que la especie tenga una tolerancia superior respecto de otras especies a la presencia de altas concentraciones de cinc en solución.

Así como se reportó para el cobre en el Capítulo 2 de esta parte de la tesis, *Salvinia minima* mostró un incremento en la remoción de cinc con el aumento de la concentración del metal en solución y la remoción fue superior en la biomasa sumergida respecto de la biomasa aérea. Esto mismo fue observado por Deval et al. (2012) para *A. caroliniana*, y Jafari y Akhavan (2011) para *Lemna minuta*, *Lemna minor* y *Lemna trisulca*. La remoción diferencial entre biomasa aérea y sumergida podría deberse, en parte, a la mayor superficie de contacto de la biomasa sumergida con el metal en solución y a la baja traslocación del metal hacia la parte aérea, evitando el daño en los tejidos fotosintéticos.

El Factor de Bioconcentración es un parámetro útil para evaluar el potencial de una planta como acumuladora de metales. En general, cuando la concentración del metal en el agua aumenta la acumulación en las plantas se incrementa también, sin embargo, el FBC disminuye (Wang y Lewis, 1997). La Figura 37 permite comparar la remoción de *S. minima* respecto de la remoción de cinc por algunas especies del género *Lemna*. En el rango de concentraciones de 10 a 20 mg Zn/L (rango al que todas las especies analizadas estuvieron expuestas) puede observarse que la remoción de cinc por *S. minima* fue menor a la remoción ejercida por las lemnáceas. Por otro lado, de acuerdo a lo informado por Lu et al. (2004) para *E. crassipes* expuesta a una concentración de 40 mg Zn/L, la concentración de cinc en la biomasa aérea fue de 1,93 mg/gr y de 9,65 mg/gr en biomasa sumergida a las 96 horas. En cambio, en el tratamiento de 40 mg Zn/L la concentración de cinc en la biomasa aérea y sumergida de *S. minima* fue de 9,01

y de 27,4 mg/gr, respectivamente. Esto implica que la fitoacumulación de cinc por *S. minima* sería mayor a la fitoacumulación por *E. crassipes* en las condiciones experimentales de ambos ensayos. Sin embargo, los valores del FBC informados por Lu et al. (2004) para *E. crassipes* (FBC entre 500 a 300) fueron muy similares a los hallados en *S. minima*. Un rango similar (426-378) fue informado también por Jafari y Akhavan (2011) para *L. minor*. El resto de las lemnáceas analizadas presentaron valores de FBC superiores.

El FBC calculado para cada tratamiento fue inferior a 1000, pero contrario a lo expuesto anteriormente, el FBC no disminuyó con el aumento del metal en solución, sino que se mantuvo sin variaciones significativas. Esto implica que la remoción por la planta fue proporcional al aumento de la concentración inicial del metal en el agua, aún a concentraciones muy elevadas del metal.



**Figura 37.** Concentración de cinc en biomasa total en función de la concentración inicial de cinc en solución en *S. minima* (presente contribución), *L. gibba* (Khellaf y Zerdaoui, 2009), *L. minuta*, *L. minor* y *L. trisulca* (Jafari y Akhavan, 2011).

De acuerdo con el criterio propuesto por Zayed et al. (1998) para considerar a una especie como hiperacumuladora, *S. minima* no sería una especie hiperacumuladora de cinc, sin embargo, *S. minima* removi6 el metal de forma tal que el porcentaje del peso seco en cinc super6 el 0,5 % entre los 10 y los 20 mg/L de cinc en solución. Por lo tanto, *S. minima* constituye una especie eficiente en la remoci6n de este metal y los

resultados obtenidos parecen demostrar que *S. minima* sería más eficiente que *E. crassipes* en la remoción del este metal.

***Conclusiones y  
consideraciones  
finales***



**E**n esta tesis doctoral se han presentado los resultados obtenidos en el marco de la aplicación de dos herramientas importantes para ser tenidas en cuenta en el Manejo y Restauración de los ecosistemas acuáticos contaminados por metales pesados como lo constituyen el Modelo del Ligando Biótico y la Fitorremediación. Ambas herramientas son útiles para la generación de normativa, manejo y monitoreo ambiental. El BLM es una herramienta con bases científicas que simula lo que ocurre en el medio acuático teniendo en cuenta las relaciones causales de toxicidad en base a información obtenida experimentalmente. Por otro lado, la fitorremediación se sustenta en la aplicación de propiedades que poseen algunas especies que las hacen capaces de reducir niveles elevados de ciertos tóxicos, metales pesados en particular. Para ambos objetivos se usaron especies nativas como modelos biológicos: *Cnesterodon decemmaculatus* y *Salvinia minima*.

En este sentido es importante considerar que estas herramientas son aplicables a distintas condiciones, sobre todo a distintas características físicas y químicas del agua, y de aquí surgió la selección de las aguas con las que se ha trabajado en esta tesis. El Río Pilcomayo representa un caso de estudio particular. Sus aguas presentan características físico-químicas extremas, tanto por los valores de sus iones principales como por la carga de sólidos que transporta. Asimismo, por ser un río de tierras áridas presenta una gran variación inter-estacional en su caudal y a lo largo de su curso presenta una serie de transformaciones, ya que pasa de ser un río de montaña a ser un río de llanura. Por último, el río ha sido y continúa siendo objeto de contaminación proveniente de la actividad minera desarrollada en la alta cuenca desde hace varios siglos, habiéndose incrementado la contaminación crónica por metales pesados en los últimos 30 años. En la cuenca media y baja, los principales tensores ambientales son el elevado nivel de sólidos en suspensión y la consiguiente migración del río dentro de su cuenca de drenaje. Por lo tanto, la aplicación de modelos que permitan estudiar la problemática de los metales pesados teniendo en cuenta la dinámica hidrológica, física y química de este río en la cuenca baja permitirá definir niveles guía de referencia para la calidad del agua y alertar sobre situaciones de riesgo potenciales para la biota.

El estudio inter-estacional de la hidrología e hidroquímica del Río Pilcomayo permitió determinar que, en el lapso de tiempo estudiado (1961-2008), el río mostró un hidrograma característico de un río de tierras áridas no regulado, con una tendencia estadísticamente significativa de aumento en el caudal medio anual, el cual se vio reflejado, a lo largo de la serie de tiempo estudiada, en el aumento significativo del caudal medio de la estación húmeda. La variación tan importante en el caudal es uno de los determinantes de la hidroquímica característica del Río Pilcomayo. El estudio de la variación inter-estacional de los iones mayoritarios, y sólidos en suspensión en la cuenca baja del Río Pilcomayo, permitió determinar que todos los iones mayoritarios estudiados, a excepción del potasio, presentan una variación inter-estacional, con valores superiores durante la estación seca. Por otra parte, los sólidos totales en suspensión también presentan una variación inter-estacional pero con un patrón opuesto al de los iones, siendo mayores durante la estación húmeda. Estas variaciones estarían originadas por los procesos que predominan en cada estación, es decir, las bajas precipitaciones y elevada evaporación durante la estación seca, lleva a una mayor concentración de la mayoría de los solutos en solución. Por otra parte, las elevadas precipitaciones durante la estación húmeda aportan grandes cantidades de agua con bajo contenido iónico produciendo un efecto de dilución. Asimismo, se genera una gran erosión de los suelos de la alta cuenca, favorecida por el terreno escarpado y la escasa vegetación. Esto da origen a la elevada carga de sólidos en suspensión, dando al Río Pilcomayo el carácter de ser uno de los ríos con mayor transporte de sedimentos en el mundo. De acuerdo con los diagramas de Gibbs, el mecanismo determinante del contenido iónico en el agua del Río Pilcomayo en Misión La Paz sería la evaporación-cristalización tanto en la estación húmeda como en la seca, con una pequeña influencia de la meteorización en la estación húmeda. De esta forma, las aguas tienden a ser sódicas-cloruradas en la estación seca y bicarbonatadas con concentraciones similares de sodio y calcio en la estación húmeda. Dado que el Río Pilcomayo se transforma en un río de llanura al entrar en territorio argentino, el principal mecanismo determinante del contenido iónico es aquel propio de los ríos de llanura, contrario a la cuenca alta, donde domina la meteorización.

Teniendo en cuenta la explotación minera en la alta cuenca, se realizó un análisis inter-estacional de las fracciones total, particulada y disuelta de cobre, cinc, cadmio y plata en agua del Río Pilcomayo en Misión La Paz. De acuerdo a los resultados obtenidos, el cinc es, de los metales estudiados, el más abundante en el río seguido por el cobre. La fracción total de estos metales fue notablemente superior a la fracción disuelta lo cual es esperable dada la gran cantidad de sólidos suspendidos en este río. La fracción total de cobre, cinc y cadmio mostraron una variación inter-estacional, con valores medios superiores durante la estación húmeda. Por otro lado, la fracción particulada de solo el cinc y el cadmio presentó una variación inter-estacional en sus valores medios siendo estos mayores durante la estación seca. La fracción disuelta de los cuatro metales no varió apreciablemente entre estaciones. En el caso de la plata, la concentración total, y sobre todo, la concentración disuelta en el río fue no detectable en un gran porcentaje de las fechas de muestreo en ambas estaciones. En ninguna de las fechas de muestreo empleadas para el análisis, la concentración disuelta de cobre, cinc y cadmio superó el valor de los Niveles Guía para la Protección de la Biotá Acuática. En cambio, la concentración disuelta de plata fue superior al nivel guía, en sólo dos muestreos en los que el metal fue detectable.

La especiación de los metales pesados que puedan estar presentes en un cuerpo de agua inevitablemente está determinada por la hidroquímica del mismo. La especiación es, a su vez, determinante de la biodisponibilidad y toxicidad de los metales sobre la biota acuática. De aquí surgió la realización de ensayos de toxicidad aguda con la especie *C. decemmaculatus*, en aguas de características físicas y/o químicas extremas: Río Pilcomayo y Arroyo Morales. El Arroyo Morales (Cuenca alta del río Matanza-Riachuelo), constituye un sitio de referencia para la Cuenca del Río Matanza-Riachuelo por sus bajos niveles de metales pesados disueltos y los elevados niveles de oxígeno disuelto. Por otra parte, se caracteriza por la elevadísima alcalinidad y altos niveles de sodio.

Los ensayos de toxicidad en *C. decemmaculatus* en agua del Río Pilcomayo permitieron determinar que la toxicidad aguda de los metales estudiados mostró el siguiente patrón: plata>cobre>cadmio>>cinc y en agua del Arroyo Morales; cobre>>cinc. Por otra parte, la toxicidad aguda del cobre en *C. decemmaculatus* fue

superior en agua del Arroyo Morales con respecto al agua del Río Pilcomayo. La toxicidad aguda del cinc; mostró el patrón contrario.

¿Qué variables físico-químicas de las aguas experimentales influyeron en la toxicidad observada? Para el caso de la toxicidad aguda del cobre en *C. decemmaculatus*, la dureza fue el factor protector más importante en agua del Río Pilcomayo. La mayor toxicidad del cobre obtenida para el agua del Arroyo Morales, se debió no sólo a la menor dureza, sino a que está constituida principalmente por magnesio, y a la posible toxicidad del cobre complejo a la materia orgánica en solución cuya proporción fue muy superior respecto al agua del Río Pilcomayo. La toxicidad aguda del cinc en *C. decemmaculatus*, no pareció haber estado influida por la dureza en ninguna de las dos aguas experimentales. La elevadísima alcalinidad y la mayor concentración de materia orgánica en solución del Arroyo Morales respecto del Río Pilcomayo habrían sido los factores más importante en la diferente toxicidad observada tanto a elevadas ( $>2$  mg/L) como a bajas concentraciones de cinc ( $<2$  mg/L), respectivamente. En el caso del cadmio, la elevada dureza del Río Pilcomayo es posible que haya ejercido el principal efecto protector, dado que el cadmio se encontró mayormente en su forma iónica libre. En el caso de la plata, el metal con mayor toxicidad de los estudiados, si bien el papel de la dureza como agente protector no está del todo claro, es posible que la elevada dureza del Río Pilcomayo ejerciera algún efecto reduciendo la toxicidad. Otro factor como el pH y la elevada concentración de cloruros en el agua del Río Pilcomayo podrían también haber tenido algún efecto reduciendo la biodisponibilidad del metal.

El BLM constituye una herramienta que relaciona la especiación de los metales con su toxicidad en organismos acuáticos. Para expandir el rango de aplicación y utilidad de esta herramienta es importante aplicarla a aguas con distintas características físico-químicas y a distintas especies, ya que la validez de una extrapolación inter-específica del modelo implicaría poder comparar las especies únicamente en cuanto a su sensibilidad intrínseca al tóxico, sin efectos dados por calidades de agua diferentes. Asimismo, la validez de sus predicciones en aguas naturales de nuestro país y, para una especie nativa como *C. decemmaculatus*, podría constituir un primer paso para que esta herramienta pueda ser considerada para su aplicación en el ámbito local tanto a nivel

regulatorio y de manejo de los recursos. Por estas razones se aplicó el BLM, obteniéndose un valor de toxicidad aguda de cada metal estudiado para la especie holártica *P. promelas* en las aguas experimentales. La única predicción de toxicidad del modelo que fue precisa con respecto a lo observado experimentalmente para *C. decemmaculatus*, fue para el cobre en agua del Río Pilcomayo. Sin embargo, en un agua con un valor de alcalinidad que supera ampliamente el límite superior de calibración del BLM como lo constituye el agua del Arroyo Morales, el modelo sobrestimó el efecto de este parámetro prediciendo una toxicidad menor a la observada. Para el resto de los metales, la predicción del modelo sobrestimó la toxicidad, indicando que *P. promelas* sería más sensible que *C. decemmaculatus* para los tóxicos estudiados.

En este punto hay varios factores que deben tenerse en cuenta, por un lado, como se ha mencionado, el BLM ha sido desarrollado a partir de información ecotoxicológica limitada en cuanto al rango de valores de las variables físico-químicas a partir de las cuales determina la especiación y toxicidad de los metales. Asimismo, dicha información ecotoxicológica corresponde mayormente a estadios muy tempranos de *P. promelas*, individuos de tan sólo horas de vida a algunos días de vida. Los estudios ecotoxicológicos en estos estadios se realizaron con el objeto de obtener valores de toxicidad más conservativos, ya que se sabe que estadios más avanzados son menos sensibles. En la presente tesis doctoral se ha trabajado con individuos juveniles y adultos, por lo tanto, uno de los factores que pudo haber influido en la menor toxicidad del cinc, el cadmio y la plata observada en *C. decemmaculatus* fue posiblemente la mayor edad de los individuos experimentales. Por otra parte, y según se encuentra documentado, la sensibilidad al cinc y el cadmio sería marcadamente variable entre especies. Por ende, posiblemente *C. decemmaculatus* podría ser efectivamente menos sensible a estos metales que *P. promelas*. En el caso del cobre, cabe destacar que el desarrollo del BLM para este metal es el más avanzado, lo cual podría estar relacionado a la precisión de la predicción en agua del Río Pilcomayo.

Dada la dinámica inter-estacional de la hidroquímica del Río Pilcomayo, ¿cómo influye la variación inter-estacional de los principales parámetros físico-químicos de agua del Río Pilcomayo sobre la toxicidad de los metales en la biota acuática, más precisamente en peces? El factor con mayor influencia sobre la toxicidad de los metales

sería la dureza. Por lo tanto, dado que la dureza experimenta un significativo aumento durante la estación seca, cabe esperarse un mayor efecto protector en esta estación.

La realización de ensayos de toxicidad por metales pesados en aguas naturales de nuestro país y con especies nativas, como los desarrollados en esta tesis, permitirá en el futuro desarrollar niveles guía más específicos para nuestras especies y cuerpos de agua. Es preciso también, poder realizar ensayos de toxicidad en un mayor número de especies para abarcar un rango más amplio de sensibilidad ya que *C. decemmaculatus* mostró que su sensibilidad a los metales estudiados sería menor que la sensibilidad de *P. promelas*, una especie con una tolerancia similar a condiciones ambientales adversas. Actualmente el BLM está siendo considerado y aplicado en diversos países para la obtención de niveles guía sitio-específicos. Más aún, la US EPA lo recomienda para la obtención del Niveles Guía para la Protección de la Biota Acuática para el cobre. Por lo tanto, sería importante continuar con la evaluación de la validez de una extrapolación inter-específica del modelo en especies nativas para poder aplicar esta herramienta a nivel local.

Cabe destacar que en el Río Pilcomayo, los metales se encontraron mayormente asociados a los sólidos en suspensión. Sin embargo, para evitar que la presencia de los sólidos mismos ó los metales asociados pudiesen ejercer mortalidad, el agua de los ensayos fue filtrada y centrifugada. Dado el importante rol de los sólidos en la biodisponibilidad de los metales pesados en el Río Pilcomayo, sería importante analizar los procesos de sorción-desorción simulando alguno los importantes cambios inter-estacionales que se producen en este río. Esto permitiría obtener un mayor entendimiento de la dinámica de estos contaminantes en el río y, por consiguiente, hacer un aporte para lograr una normativa y manejo más específicos.

Para lograr una correcta gestión de sitios contaminados, el registro, el diagnóstico y la posterior remediación son necesarios para poder integrarlos nuevamente a la economía. La fitorremediación constituye una herramienta que viene siendo aplicada ampliamente en varios países ya sea para el tratamiento de aguas y efluentes, a través de la construcción de humedales artificiales ó para la restauración de riberas y áreas afectadas por contaminación industrial y minera que han deteriorado la

calidad del suelo por la liberación fundamentalmente de metales pesados e hidrocarburos.

Para la aplicación de esta tecnología en nuestro país es preciso conocer las especies nativas que podrían ser utilizadas, de allí el estudio que se ha realizado en esta tesis de la eficiencia en la remoción de nutrientes por las especies *S. minima* y *L. gibba*, y de metales por la especie *S. minima*. Asimismo, la implementación de ambas especies en simultáneo podría incrementar la eficiencia del proceso, por ello también se ha estudiado el crecimiento de la especie *S. minima* y la lemnácea *L. gibba* en cultivos mixtos.

Las aguas y efluentes factibles de biorremediar a través de la fitorremediación no sólo presentan diferentes características físico-químicas asimismo pueden contener varios contaminantes cuyas concentraciones se desea reducir a través de este proceso. Algunos de esos contaminantes constituyen macro y micro-nutrientes para las plantas, es el caso del nitrógeno y el fósforo y del cobre y el cinc, respectivamente. El estudio de la remoción de especies de nitrógeno inorgánico permitió determinar que en medios de cultivo donde el nitrógeno se suplementó a elevadas concentraciones (>20 mg/L), los sistemas que contenían *S. minima* y *L. gibba* removieron más del 90 % del nitrógeno que también estuvo acompañado por una gran remoción de especies solubles de fósforo. Esto implica que la eficiencia de estos sistemas es superior en medios con muy elevada concentración de nitrógeno inorgánico, probablemente por un consumo luxuriante por parte de las plantas. Cabe destacar que si bien no se ha medido en esta tesis, las bacterias también podrían haber contribuido en la remoción observada y, según algunos autores, en forma importante. Actualmente, la intensificación de las actividades agropecuarias ha llevado a la contaminación de aguas superficiales y subterráneas introduciendo elevados niveles de nitratos, por lo tanto, la aplicación de sistemas de remediación que contengan estas especies permitiría la reducción del exceso de estos nutrientes evitando la eutrofización de aguas.

¿Es factible aumentar la remoción aplicando ambas especies simultáneamente? Los resultados obtenidos indicaron que la remoción tanto de distintas formas de nitrógeno inorgánico como de fósforo solubles en los sistemas mixtos fue similar a la de las especies en monocultivo. Es decir, no se vio un efecto sinérgico en la remoción de

estos macronutrientes. Esto implica que no habría una ventaja en el uso simultáneo de ambas especies. Asimismo, en las condiciones experimentales, la presencia de *S. minima* tuvo un efecto negativo sobre *L. gibba* ya que ésta última mostró una reducción en su crecimiento. Consecuentemente, se podría pensar que en el corto ó mediano plazo *S. minima* dominaría el sistema. Sin embargo, *S. minima* muestra un importante retroceso durante la época invernal, por lo tanto, la aplicación simultánea de ambas especies en sistemas de remediación podría asegurar la presencia de vegetación a lo largo del año, con dominancia de *S. minima* en verano y de *L. gibba* en invierno.

En general, los efluentes y muchos cuerpos de agua naturales reciben descargas mixtas de contaminantes, que incluyen metales pesados y exceso de nitrógeno y fósforo. En uno de los ensayos desarrollados se probó la eficiencia en la remoción de nutrientes teniendo en cuenta la presencia de concentraciones crecientes de cobre en solución, y no se observó efecto alguno sobre la remoción de las especies de nitrógeno inorgánico y fósforo soluble. Es más, en concentraciones en las que el efecto tóxico del cobre fue evidente ( $\geq 50$  mg/L), ya que las plantas presentaron aspecto senescente rápidamente, la remoción de nitrógeno se redujo levemente pero la de fósforo soluble se incrementó producto probablemente de la adsorción a nuevos sitios expuestos y material fragmentado. Por otro lado, *S. minima* mostró también una gran tolerancia a elevadas concentraciones de cobre y de zinc, tolerando concentraciones  $< 50$  mg/L y de 40 mg/L, respectivamente. Se observó una acumulación de los metales en la biomasa con el aumento del metal en solución, siendo mayor en biomasa sumergida que en aérea. Teniendo en cuenta que en la industria metalúrgica, por ejemplo, los efluentes suelen contener concentraciones de cobre y cinc superiores a los 100 mg/L, estos resultados demuestran que la carga de estos metales en diluciones de estos efluentes podría reducirse en sistemas con *S. minima*.

El principal mecanismo de remoción de cobre en *S. minima* resultó ser la biosorción. En el caso de la fitorremediación de metales pesados resulta de suma importancia determinar en que compartimento se encuentra mayoritariamente el metal removido ya que de ello dependerá el destino que se le dé a la biomasa vegetal. En este sentido, la disposición de la biomasa vegetal con elevado contenido de metal en rellenos sanitarios ó aplicada como composta resulta cuestionable, ya que por lixiviación el



metal puede liberarse, y la incineración también requiere de un tratamiento posterior, es por ello que algunos autores han llegado a la conclusión que la lixiviación del metal asociado a la biomasa vegetal mediante el tratamiento con un agente extractante ó quelante parece la mejor opción para la posterior recuperación del metal. Por lo tanto, la biosorción como principal mecanismo de remoción del cobre en *S. minima* constituye otro factor que favorece la selección de esta especie para un proceso de fitorremediación, ya que permitiría una recuperación relativamente sencilla del metal removido. Otra ventaja que favorece el uso de esta especie es la baja traslocación del metal a la biomasa aérea. Considerando que el estado de las plantas en los tratamientos de elevadas concentraciones de metales (<50 mg/L) no era visualmente diferente a los controles, la estrategia de baja traslocación evidencia un efecto protector del mecanismo de fotosíntesis. Es una estrategia compartida con otras especies que toleran y pueden vivir en sitios contaminados con niveles altos de metales pesados excluyendo el metal de la maquinaria fotosintética.

Por otra parte, *S. minima* resultó ser muy eficiente en la remoción de cobre y cinc. Las concentraciones de cobre y cinc en la planta se incrementaron rápidamente superando el 0,5 % para las concentraciones más elevadas de metal en solución (>5 mg/L). Otro parámetro que es tenido en cuenta para evaluar la eficiencia es el Factor de Bioconcentración. Sin embargo, para las condiciones en las que se realizaron los ensayos no resultó el mejor indicador de eficiencia debido a que se produjo una rápida precipitación del metal, disminuyendo la concentración en solución y su biodisponibilidad.

La aplicación de *S. minima* para tratar ambientes contaminados por elevados niveles de cobre, zinc y nutrientes (nitrógeno y fósforo) parece ser una herramienta recomendable. La especie posee una elevada tasa de crecimiento y produce grandes cantidades de biomasa en poco tiempo, tolera elevados niveles de metales pesados en agua sin modificar su crecimiento y, a su vez, acumula los metales, fundamentalmente en los órganos sumergidos. Sin embargo, sería importante analizar la dinámica del metal contenido en la biomasa durante el proceso de descomposición ya que, posiblemente, la biomasa pueda liberar el metal por lixiviación ó por el contrario y, como se observó para las especies de fósforo solubles, la remoción podría incrementarse

por la exposición de nuevos sitios para la adsorción del metal. Los resultados de un análisis de este tipo serían importantes para lo que constituye el monitoreo y manejo de un humedal de tratamiento de aguas ó efluentes con *S. minima*.

Los criterios de calidad del agua destinados a sitios específicos están cobrando importancia en muchos países. En el caso de aguas con características químicas extremas como las estudiadas en esta tesis, estos criterios son relevantes. La composición química de las aguas del Río Pilcomayo y del Arroyo Morales determina niveles de toxicidad distintos a los que se esperaría aplicando índices clásicos de calidad basados únicamente en los valores de los distintos parámetros. Asimismo, el clima, la geología y la hidrología determinan cambios en las variables químicas del agua, que influyen en la biodisponibilidad y toxicidad. La aplicación de modelos que permitan la conexión entre ambos factores, posibilitaría poder anticipar el riesgo de una determinada carga de contaminantes.

El trabajo realizado en esta tesis contribuye no sólo a incrementar el conocimiento científico de especies acuáticas nativas sino que también contribuye con la evaluación de herramientas que puedan ser aplicadas, en un futuro, en la generación de una normativa y en el manejo y monitoreo ambiental de las aguas basados en las características propias de nuestras especies y nuestros cuerpos de agua.

## *Referencias*

- Ærtebjerg, G., Andersen, J. H., Hansen, O. S. (Eds.) 2003. Nutrients and eutrophication in Danish marine waters. A challenge for science and management. National Environmental Research Institute. 126 pp. En: <http://www.eea.europa.eu/themes/water/water-pollution>.
- AGOSBA-OSN-SIHN, 1992. Río de La Plata Calidad de las Aguas, Franja Costera Sur (San Isidro – Magdalena). Hidrografía Naval, Buenos Aires.
- Ait Ali N., Bernal M. P., and Ater M., 2004. Tolerance and bioaccumulation of Cd by *Phragmites australis* grown in the presence of elevated concentration of cadmium, copper, and zinc. *Aquat. Bot.* 80: 163D176.
- Al-Hamdani S. H. y Blair S. L., 2004. Influence of copper on selected physiological responses in *S. minima* and its potential use in copper remediation. *Am. Fern Journal* 94(1): 47-56.
- Aoi, T., Hayashi, T., 1996: Nutrient removal by water lettuce (*Pistia stratiotes*). *Water Sci. Tech.* 34: 407-412.
- APHA – AWWA – WPCF, 1992. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Ed. Díaz de Santos. S. A. Madrid, España.
- Baker A.J.M., 1981. Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutr.* 3: 643-654.
- Baldisserrotto, B., Kamunde, C., Matsuo, A., Wood, C.M., 2004. A protective effect of dietary calcium against acutewaterborne cadmium uptake in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 67: 57–73.
- Bates S., Tessier A., Campbell P., Buffle J., 1982. Zinc adsorption and transport by *Chlamydomonas variabilis* and *Senedesmus subspicatus* (Chlorophyceae) grown in semicontinuous culture. *J. Phycol.* 18: 521-529.
- Bertness M.D. y Callaway R., 1994. Positive interactions in communities. *Trends in Ecological Evolution* 9: 191–193.
- Bianchini A., y Bowles K. C., 2002. Metal sulfides in oxygenated aquatic systems: implications for the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 133: 51–64.
- Bielmyer G. K., Grosell M., Paquin P. R., Mathews R., Wu K. B., 2007. Validation study of the acute Biotic Ligand Model for silver. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 10: 2241-2246.
- Bielmyer G.K., Brix K.V., Grosell M., 2008. Is Cl<sup>-</sup> protection against silver toxicity due to chemical speciation? *Aquatic Toxicology* 87: 81–87.

- Birge W.J., Benson W.H., Black J.A., 1983. The Induction of Tolerance to Heavy Metals in Natural and Laboratory Populations of Fish Res.Rep.No.141, Water Resour.Res.Inst., Univ.of Kentucky, Lexington, KY:26 p.
- Bradley R. M. y Sprague J. B., 1985. The influence of pH, water hardness and alkalinity on the acute lethality of zinc to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science 42: 731-736.
- Bringolf R. B., Morris B. A., Boese C. J., Santore R. C., Allen H. E., Meyer J. S., 2006. Influence of dissolved organic matter on acute toxicity of zinc to larval fathead minnows (*Pimephales promelas*) Arch. Environ. Contam. Toxicol. 51: 438–444.
- Brinkman, S.F., Hansen, D.L., 2007. Toxicity of cadmium to early life stages of brown trout (*Salmo trutta*) at multiple water hardnesses. Environ. Toxicol. Chem. 26: 1666–1671.
- Brown, D. H. (1982). Mineral nutrition. In *Bryophyte Ecology* (A. J. E. Smith, Ed.), pp. 383-443. Academic Press, London.
- Brown D.H. y Buck G. W., 1985. The cellular location of metals in two bryophytes and a lichen. Crypto. Bryol. Lichen. 6 (3): 279-286.
- Bryan S.E., Tipping E., Hamilton-Taylor J., 2002 Comparison of measured and modelled copper binding by natural organic matter in freshwaters. Comp. Biochem. Physiol. C 133: 37–49.
- Bury, N.R., Galvez, F., Wood, C.M., 1999. Effects of chloride, calcium, and dissolved organic carbon on silver toxicity: comparison between rainbow trout and fathead minnows. Environ. Toxicol. Chem. 18: 56–62.
- Bury, N.R., Wood, C.M., 1999. Mechanism of branchial apical silver uptake by rainbow trout is via the proton-coupled Na<sup>+</sup> channel. Am. J. Physiol. 277, R1385–R1391.
- Calamari, D., Marchetti, R., Vailati, G., 1980. Influence of water hardness on cadmium toxicity to *Salmo gairdneri* Rich. Water Res. 14: 1421–1426.
- Cao, J., Xue, H.B., Sigg, L., 2006. Effects of pH and Ca competition on complexation of cadmium by fulvic acids and by natural organic ligands from a river and a lake. Aquat. Geochem. 12: 375–387.
- Carvalho Gomes L., Chippari-Gomes A. R., Nunes Oss R., Loureiro Fernandes L. F., de Almeida Magris R., 2009. Acute toxicity of copper and cadmium for piauçu, *Leporinus macrocephalus*, and curimatã, *Prochilodus vimboides*. Acta Scientiarum. Biological Sciences Maringá 31 (3): 313-315.

- Carvalho, C.S., Fernandes, M.N., 2006. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture* 251: 109–117.
- Casares M. V., de Cabo L I., Seoane R S., Natale O. E., Castro Rios M., Weigandt C, F. de Iorio A., 2012. Measured copper toxicity to *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae) and predicted by Biotic Ligand Model in Pilcomayo River water: a step for a cross-fish-species extrapolation. *Journal of Toxicology* Vol. 2012, 11 pp. En: <http://www.hindawi.com/journals/jt/2012/849315/>
- Castillo, V., III, Longley, G., 2001, Comparison of EPA target toxicity aquatic test organisms to the fountain darter: 7 day chronic toxicity test using cadmium chloride, performed 11/12/99–3/6/00 (5 parts): San Marcos, Tex., Edwards Aquifer Research and Data Center (EARDC), Southwest Texas State University, Fed. Assist. Agree. No. X 986345-01 (5 parts), 179 p.
- Caudales R., Vega H. E., Sanchez P. A., Liogier H. A., 1999. Aquatic and wetland plants of Puerto Rico. I Pteridophyta. *An. Jard. Bot. Madr.*57: 333-339.
- Chaney A.L. y Marbach E.P., 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8:130-132.
- Ciria M. P., Solano M. L., Soriano P., 2005. Role of macrophyte *Typha latifolia* in a constructed wetland for wastewater treatment and assessment of its potential as a biomass fuel. *Biosystems Engineering* 92(4): 535-544.
- Clatworthy J. N. y Harper J. L. 1962. The comparative biology of closely related species living in the same area. 5. Inter- and intraspecific interference within cultures of *Lemna* spp. and *Salvinia natans*. *Journal of Experimental Botany* 13: 307–324.
- Clifford M. y McGeer J. C., 2009. Development of a biotic ligand model for the acute toxicity of zinc to *Daphnia pulex* in soft waters. *Aquatic Toxicology* 91: 26–32.
- Clifford M. y McGeer J. C., 2010. Development of a biotic ligand model to predict the acute toxicity of cadmium to *Daphnia pulex*. *Aquatic Toxicology* 98: 1–7.
- Conzonno V. H., 2009. *Limnología Química*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata. 220 pp.
- Davies M. A. y Slobodkin L. B., 2004. The science and values of restoration ecology. *Restoration Ecology* 12 (1): 1-3.
- de Cabo L., Casares M. V., Seoane R., 2009. Interacción entre *Salvinia minima* y *Lemna gibba*: efecto sobre el crecimiento en distintos medios de cultivo. *Biología Acuática* 26: 65-72.

- de la Torre, F.R., Demichelis, S.O., Ferrari, L., Salibián, A., 1997. Toxicity of Reconquista river water: bioassays with juvenile *Cnesterodon decemmaculatus*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 58: 558–565.
- de la Torre, F.R., Ferrari, L., Salibián, A., 2005. Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*): application to the toxicity assessment of the water of a periurban polluted river of Argentina. Chemosphere 59: 577–583.
- De Schamphelaere K. A. C. y Janssen C. R. 2002. A biotic ligand model predicting acute copper toxicity to *D. magna*: The effects of calcium, magnesium, sodium, potassium and pH. Environ. Sci. Technol., 36: 48-54.
- De Schamphelaere K. A. C. y Janssen Colin R., 2010. Cross-phylum extrapolation of the *Daphnia magna* chronic biotic ligand model for zinc to the snail *Lymnaea stagnalis* and the rotifer *Brachionus calyciflorus*. Science of the Total Environment 408: 5414–5422.
- De Schamphelaere K. A. C., Janssen C. R., 2004. Bioavailability and chronic toxicity of zinc to juvenile Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): comparison with other fish species and development of a Biotic Ligand Model. Environ. Sci. Technol. 38: 6201-6209.
- De Schamphelaere K. A. C.; Heijerick D. G.; Janssen C. R., 2002. Refinement and field validation of a biotic ligand model predicting acute copper toxicity to *Daphnia magna*. Comp. Biochem. Physiol. C, 133: 243-258.
- De Schamphelaere K.A.C., Lofts S., Janssen C.R., 2005. Bioavailability models for predicting acute and chronic toxicity of zinc to algae, daphnids and fish in natural surface waters. Environ. Toxicol. Chem. 24:1190–7.
- Deval C. G., Mane A. V., Joshi N. P., Saratale G. D., 2012. Phytoremediation potential of aquatic macrophyte *Azolla caroliniana* with references to zinc plating effluent Emir. J. Food Agric. 2012. 24 (3): 208-223.
- Di Toro D. M., Allen H. E., Bergman H. L., Meyer J.S., Santore R. C., Paquin P., 2000. The biotic ligand model. A computational approach for assessing the ecological effects of copper and other metals in aquatic systems. New York (NY): International Copper Association, Environmental Program.
- Di Toro D.M., Allen H.E., Bergman H.L., Meyer, J.S., Paquin P.R., Santore R.C., 2001. A biotic ligand model of the acute toxicity of metals I. Technical basis. Environ. Toxicol. Chem. 20: 2383–2396.
- Dickinson, M.B., Miller, T.E., 1998. Competition among small, free-floating aquatic plants. Am. Midl. Nat. 140: 55–67.
- Duffus J. H., 2002. "Heavy metals" a meaningless term? (IUPAC Technical Report) Pure and Applied Chemistry 74: 793–807.

- Ebrahimipour M., Alipour H., Rakhshah S., 2010. Influence of water hardness on acute toxicity of copper and zinc on fish. *Toxicol. Ind. Health*. 6: 361-365.
- Efron B. y Tibshirani R. J., 1993. *An Introduction to the Bootstrap*, Chapman & Hall, London, UK.
- Eisler R., 1985. Cadmium hazards to fish, wildlife and invertebrates. A synoptic Review. Contaminant Hazard Reviews Report No. 2. Patuxent Wildlife Research Center U.S. Fish and Wildlife Service Laurel, MD 20708.
- Eisler R., 1993. Zinc Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review. Contaminant Hazard Reviews. Report 26. U.S. Department of the Interior Fish and Wildlife Service Patuxent Wildlife Research Center Laurel Maryland 20708.
- Eisler R., 1996. Silver hazards to fish, wildlife and invertebrates: A synoptic Review. Contaminant Hazard Reviews. Report No. 32. Patuxent Wildlife Research Center U.S. National Biological Service Laurel, MD 20708.
- Eisler R., 1998. Copper hazards to fish, wildlife and invertebrates: A synoptic review. Contaminant Hazard Reviews. Report No. 33. Patuxent Wildlife Research Center U.S. Geological Survey Laurel, MD 20708.
- El-Shafai S., El-Gohary F. A., Nasr F. A., Van der Steen N. P., Gijzen H. J.. 2007. Nutrient Recovery from domestic wastewater using a UASB-duckweed ponds system. *Bioresource Technology* 98: 798-807.
- Erickson, R.J., Benoit, D.A., Mattson, V.R., Nelson, H.P., Leonard, E.N., 1996. The effects of water chemistry on the toxicity of copper to fathead minnows. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 181–193.
- Erickson, R.J., Brooke, L.T., Kahl, M.D., Venter, F. V., Harting, S.L., Markee, T.P., Spehar, R.L., 1998. Effects of laboratory test conditions on the toxicity of silver to aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 572–578.
- Everall N. C., MacFarlane N. A. A., Sedgwicks R. W., 1989. The interactions of water hardness and pH with the acute toxicity of zinc to the brown trout, *Salmo trutta* L. *J. Fish Biol.* 35: 27-36.
- Fairbrother A., Wenstel R., Sappington K., Wood W., 2007. Framework for Metals Risk Assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68: 145–227.
- Ferrari, L., García, M. E., de la Torre, F. R., Demichelis, S. O., 1998. Evaluación Ecotoxicológica del agua de un río urbano mediante bioensayos con especies nativas. *Rev. Museo Argentino de Ciencias Naturales. Vol. Extra Nueva Serie* 148: 1–16.
- Finney D. J., 1978. *Statistical Method in Biological Assay*, Charles Griffin, London.



- Frey, S. Kellogg K., Marsella K., Van Hook S., 2006. Environmental Science. McGraw-Hill, USA.
- Gaillardet J., Dupré B., Louvat P., Allègre C. J., 1999. Global silicate weathering and CO<sub>2</sub> consumption rates deduced from the chemistry of large rivers. *Chemical Geology* 159: 3-30.
- Gaudet J. J., 1973. Growth of a Floating Aquatic Weed, *Salvinia* Under Standard Conditions. *Hydrobiologia* 41 (1): 77-106.
- Ghosh M. y Singh S.P., 2005. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of it's by products. *Applied Ecology and Environmental Research* 3(1): 1-18.
- Gibbs, R.J., 1970. Mechanisms controlling world water chemistry. *Science* 170: 1088-1090.
- Golterman, H. L. and Clymo, R. S., 1969. *Methods for chemical analysis of freshwaters*. Blackwell, Oxford. 166 pp.
- Gómez S., Villar C., Bonetto C. 1998. Zinc toxicity in the fish *Cnesterodon decemmaculatus* in the Paraná River and Río de La Plata Estuary. *Environmental Pollution* 99: 159-165.
- González Naya M. J., Gómez S. E. y Ramírez L. 2005. Notas experimentales sobre *Gambusia cf. Affinis* (Osteichthyes: Poeciliidae) en Argentina. *Biología Acuática* 22:157-162.
- Gopal B. y Goel U., 1993. Competition and allelopathy in aquatic plant-communities, *Botanical Revue* 59: 155–210.
- Grime J. P., 1977. Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *American Naturalist* 111: 1169-1195.
- Grime, J.P., 1973. Competitive exclusion in herbaceous vegetation. *Nature* 242: 344-347.
- Gül A., Yilmaz M., Isilak Z., 2009. Acute Toxicity of Zinc Sulphate (ZnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) to Guppies (*Poecilia reticulata* P., 1859) G.U. *Journal of Science* 22(2): 59-65.
- Hadad H.R., Maine M.A., Natale G.S., Bonetto C., 2007. The effect of nutrient addition on metal tolerance in *Salvinia herzogii*. *Ecological Engineering* 31: 122–131.
- Hagemeyer J., 1999. Ecophysiology of plant growth under heavy metal stress. In: *Heavy Metal Stress in Plants* (Edited by Prasad MNV and Hagemeyer J) 157-81 pp. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Heijerick D.G., De Schampelaere K.A.C., Janssen C.R., 2002. Predicting acute zinc toxicity for *Daphnia magna* as a function of key water chemistry characteristics: development and validation of a biotic ligand model. *Environ Toxicol Chem.* 21:1309-15.

- Heijerick DG, De Schamphelaere KAC, Van Sprang PA, Janssen CR., 2005. Development of a chronic zinc biotic ligand model for *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 62:1-10.
- Henry J.G. y Heinke G.W., 1999. *Ingeniería ambiental*, 2da ed. Prentice Hall, Méjico, 800 pp.
- Hogstrand C., Verboost P. M., Wendelaar Bonga S. E., Wood C., 1996. Mechanisms of zinc uptake in gills of fresh water rainbow trout: interplay with calcium transport. *The American Physiological Society* R1141-R1147.
- Hollis L., Muench L., Playle R. C., 1997. Influence of dissolved organic matter on copper binding, and calcium on cadmium binding, by gills of rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 50: 703–720.
- Hudson-Edwards K.A., Macklin M.G., Miller J.R., Lechner P.J., 2001. Sources, distribution and storage of heavy metals in the Río Pilcomayo, Bolivia. *J. Geochem. Explor.* 72: 229–250.
- Huett D.O., Morris S.G., Smith G., Hunt N., 2005. Nitrogen and phosphorus removal from plant nursery runoff in vegetated and unvegetated subsurface-flow wetlands. *Water Res.* 39: 3259–3272.
- Hunn J.B., 1985. Role of calcium on gill function in freshwater fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 82A: 543–547.
- Hunt R., 1978. *Plant growth analysis. Studies in Biology No 96.* Edward Arnold Ltd., London, 67 pp.
- Hynes H. B. N., 1975. The stream and its valley. *Verh Internat Verein Limnol* 19: 1-15.
- Jacono, C.C. 2003. *Salvinia minima* Baker. US Geological Survey, US Department of the Interior. Consultado el 16 de marzo del 2004. Disponible en: <http://salvinia.er.usgs.gov/html/identification1.html>.
- Jadia C. D. y Fulekar M. H., 2009. *Review: Phytoremediation of heavy metals: Recent techniques.* *African Journal of Biotechnology* 8 (6): 921-928.
- Jafari N. y Akhavan M., 2011. Effect of pH and heavy metal concentration on phytoaccumulation of zinc by three duckweed species. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 10 (1):34-41.
- Jain S. K., Vasudevan P., Jha N., 1990. *Azolla pinnata* R. Br. and *Lemna minor* L. for removal of lead and zinc from polluted water. *Wat. Res.* 24:177-183.
- Jampeetong A. y Brix H., 2009. Nitrogen nutrition of *Salvinia natans*: Effects of inorganic nitrogen form on growth, morphology, nitrate reductase activity and uptake kinetics of ammonium and nitrate *Aquatic Botany* 90: 67–73.

- Janes N. y Playle R.C., 1995. Modeling silver binding to gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Env. Toxicol. Chem.* 14: 1847–1858.
- Judy Jr R. D. y Davies P. H., 1979. Effects of calcium addition as  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  on zinc toxicity to fathead minnows, *Pimephales promelas*, Rafinesque. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 22: 088-094.
- Karen D. J., Ownby D. R., Forsythe B. L., Bills T. P., La Point T. W., Cobb G. B., Klaine S. J., 1999. Influence of water quality on silver toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), fathead minnows (*Pimephales promelas*), and water fleas (*Daphnia magna*) *Environmental Toxicology and Chemistry* 18 (1): 63-70.
- Karlsson, T., Elgh-Dalgren, K., Skyllberg, U., Björn, E., 2007. Complexation of cadmium to sulfur and oxygen functional groups in an organic soil. *Geochim. Cosmochim. Acta* 71: 604–614.
- Kennedy C. J., 2011. The toxicology of metals in fishes. In: *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment*. Farrell A. P. (ed). San Diego: Academic Press 3: 2061-2068.
- Khellaf N. y Zerdaoui M., 2009. Phytoaccumulation of zinc by the aquatic plant, *Lemna gibba* L. *Bioresource Technology* 100: 6137–6140.
- Körner S. y Vermatt J. E., 1998. The relative importance of *Lemna gibba* L., bacteria and algae for the nitrogen and phosphorus removal in duckweed-covered domestic. *Wat. Res.* 32 (12):3651-3661.
- Lahitte H. B., Hurrell J. A., Mehlreter K., et al, 2004. *Biota Rioplatense I. Plantas de la Costa*. 1ra ed. Edición L.O.L.A. Buenos Aires, 200 pp.
- Lambers H., Stuart Chapin III F., Pons T. 1998. *Plant Physiological Ecology*. Springer- Verlag, New York 539 pp.
- Lauren D.J. y McDonald D.G., 1985. Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbowtrout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Comp. Physiol.* 155: 635–644.
- Li L., Li Y., Biswas D. K., Nian Y., Jiang G., 2008. Potential of constructed wetlands in treating the eutrophic water: Evidence from Taihu Lake of China. *Bioresource Technology* 99: 1656-1663.
- Lu X., Kruatrachue M., Pokethitiyook P., Homyok K., 2004. Removal of Cadmium and Zinc by Water Hyacinth, *Eichhornia crassipes*. *ScienceAsia* 30: 93-103.
- Lu Y. y Allen H. E., 2001. Partitioning of copper onto suspended particulate matter in river waters. *Sci Total Environ* 277: 119-132.

- Mackereth F, Heron J, Talling J., 1989. Water Analysis: some revised methods for limnologists. (Kendal: Titus Wilson and Son Ltd.).
- Maeda S., Mizogushi M., Ohki A., Takeshita T., 1990. Bioaccumulation of zinc and cadmium in freshwater alga, *Chlorella vulgaris*. Part II. Association mode of the metals and cell tissue, *Chemosphere* 21: 965-973.
- Maine M. A., Duarte M. V., Suñé N. L., 2001. Cadmium uptake by floating macrophytes. *Wat. Res.* 35 (11): 2629–2634.
- Maine M. A., Suné N. L., Lagger S. C., 2004. Chromium bioaccumulation: comparison of the capacity of two floating aquatic macrophytes. *Water Research* 38: 1494–1501.
- Maine M. A., Suñé N. L., Hadad H., Sánchez G., Bonetto C., 2009. Influence of vegetation on the removal of heavy metals and nutrients in a constructed wetland. *Journal of Environmental Management* 90: 355-363.
- Margalef R., 1960. Ideas for a synthetic approach to the ecology of running waters. *Int. Revue ges Hydrobiol.* 45: 133-153.
- Markham A., 1994. A Brief History of Pollution. St. Martin's Press, New York, 162 pp.
- Markich S. J., King A.R., Wilson S.P., 2006. Non-effect of water hardness on the accumulation and toxicity of copper in a freshwater macrophyte (*Ceratophyllum demersum*): How useful are hardness-modified copper guidelines for protecting freshwater biota? *Chemosphere* 65: 1791–1800.
- Matsuo A.Y.O., Playle R.C., Val A.L., Wood C.M., 2004. Physiological action of dissolved organic matter in rainbow trout in the presence and absence of copper: sodium uptake kinetics and unidirectional flux rates in hard and soft water. *Aquat. Toxicol.* 70: 63–81.
- McGeer J.C., Szebedinszky C., McDonald D.G., Wood C.M., 2002. The role of dissolved organic carbon in moderating the bioavailability and toxicity of Cu to rainbow trout during chronic waterborne exposure. *Comp. Biochem. Physiol.* 133: 147–60.
- Medina Hoyos R. I. y Smolders A. J. P., 2005. Contaminación del Río Pilcomayo y el Moderno Proceso de Flotación en el Distrito Minero de Potosí-Bolivia: Una propuesta metodológica de evaluación de la contaminación minera. Ponencia en el Master en Ingeniería del Agua Grupo TAR – U.S. Los Palacios, Sevilla, España.
- Menni R. C. 2004. Monografías del Museo Argentino de Ciencias Naturales Peces y Ambientes en la Argentina Continental 50-52 pp.
- Meyer J.S., Santore R.C., Bobbitt J.P., et al., 1999. Binding of nickel and copper to fish gills predicts toxicity when water hardness varies, but free-ion activity does not. *Environ. Sci. Technol.* 33: 913–916.

- Moen R. A. y Cohen Y., 1989. Growth and competition between *Potamogeton pectinatus* L. and *Myriophyllum exalbescens* Fern. in experimental ecosystem. *Aquat. Bot.* 33: 257–270.
- Molero A. M. y Pisanó A., 1987. Estadíos de desarrollo de *Cnesterodon decemmaculatus* (Pises, Poeciliidae) *Revista Brasileira de Biología* 47 (1/2):115-125.
- Morel F. M., 1983. Complexation: trace metals and microorganisms. *Principles of Aquatic Chemistry*.
- Morgan T. P., Grosell M., Gilmour K. M., Playle R., Wood, C.M., 2004. Time course analysis of the mechanism by which silver inhibits active Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> uptake in gills of rainbow trout. *Am J Physiol Regul Comp Physiol* 287: R234-R242.
- Mount D.I., 1966. The effect of total hardness and pH on acute toxicity of zinc to fish. *Int. J. Air Water Pollut.* 10.
- Mouvet C. y Claveri B., 1999. Localization of copper accumulated in *Rhynchostegium riparioides* using sequential chemical extraction. *Aquatic Botany* 63: 1-10.
- Natale O.E., Gómez C.E, Leis M.V., 2007. Application of the Biotic Ligand Model for regulatory purposes to selected rivers in Argentina with extreme water-quality characteristics. *Integr. Environ. Assess. Manag.* Vol. 3 (4): 517-528.
- Nebeker A.V., McAuliffe C.K., Mshar R., Stevens D.G., 1983. Toxicity of silver to steelhead and rainbow trout, fathead minnows and *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 2: 95–104.
- Newey W. K. y McFadden D., 1994. “Chapter 36 large sample estimation and hypothesis testing,” *Handbook of Econometrics*, vol. 4, pp. 2111–2245, 1994.
- Newey W. K. y West K. D., 1987. “Hypothesis testing with efficient method of moments estimation,” *International Economic Review* 28:777–787.
- Newman M. C., Ownby D. R., Mezin L. C.A., Powell D. C., Christensen T. R.L., Lerberg S. B. y Anderson B-A., 2000. Applying species-sensitivity distributions in ecological risk assessment: assumptions of distribution type and sufficient numbers of species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19 (2): 508–515.
- Nichols P.B., Couch J.D., Al Hamdani S.H., 2000. Selected physiological responses of *Salvinia minima* to different concentrations of chromium. *Aquat. Bot.* 68: 313-319.
- Niyogi S. y Wood C. M., 2004. Biotic Ligand Model, a Flexible Tool for Developing Site-Specific Water Quality Guidelines for Metals Critical Review. *Environmental Science and Technology* 38 (23): 6177-6192.

- Niyogi S., Kent R., Wood C. M., 2008. Effects of water chemistry variables on gill binding and acute toxicity of cadmium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A biotic ligand model (BLM) approach. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 148: 305–314.
- Niyogi, S. y Wood, C.M., 2004. Kinetic analyses of waterborne calcium and cadmium transport and their interactions in the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and yellow perch (*Perca flavescens*), two fish species differing greatly in acute cadmium sensitivity. *J. Comp. Physiol., B* 174: 243–253.
- Noraho N. y Gaur J.P., 1996. Cadmium adsorption and intracellular uptake by two macrophytes, *Azolla pinnata* and *Spirodela polyrrhiza*. *Arch Hydrobiol* 136: 135–144.
- Olguín E. J., Hernández E. y Ramos I., 2002. The effect of both different Light conditions and the pH value on the capacity of *Salvinia minima* Baker for removing cadmium, lead and chromium. *Acta Biotechnol* 22 1-2: 121-131.
- Olguín E. J., Sánchez-Galván G., Pérez-Pérez T., y Pérez-Orozco A., 2005. Surface adsorption, intracellular accumulation and compartmentalization of Pb (II) in batch-operated lagoons with *Salvinia minima* as affected by environmental conditions, EDTA and nutrients. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32: 577–586.
- Pagenkopf G.K., 1983. Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH, and water hardness. *Environ. Sci. Technol.* 17: 342–347.
- Paquin P.R., Gorsuch, J.W., Apte, S., Batley G.E., Bowles K.C., Campbell P.G.C., Delos C. G., Di Toro D.M., Dwyer R.L., Galvez F., Gensemer R.W., Goss G.G., Hogstrand C., Janssen C.R., McGeer J.C., Naddy R.B., Playle R.C., Santore R.C., Schneider U., Stubblefield W. A., Wood C.M, Wu K.B., 2002. The biotic ligand model: a historical overview. *Comp. Biochem. and Physiol. C* 133: 3–35.
- Paquin P.R., Zoltay V., Winfield R.P., Wu K.B., Rooni M., Santore R.C., Di Toro D.M, 2002. Extension of the biotic ligand model of acute toxicity to a physiologically-based model of the survival time of rainbow trout exposed to silver. *Comp. Biochem. and Physiol. Part C* 133: 305-343.
- Pellicciotti F., Burlando P.y van Vliet K., 2007. Recent trends in precipitation and streamflow in the Aconcagua river basin, central Chile. *IAHS Publ.* 318 (Assembly at Foz do Iguacu 2005 – *Glacier Mass Balance Changes and Meltwater Discharge*).
- Pilon-Smits E., 2005. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56:15-39.
- Playle R.C., Dixon D.G., Burnison K., 1993. Copper and cadmium binding to fish gills: estimates of metal–gill stability constants and modeling of metal accumulation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50: 2678–2687.

- Playle R.C., Gensemer R.W., Dixon D.G., 1992. Copper accumulation on gills of fathead minnows: influence of water hardness, complexation and pH on the gill microenvironment. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 381–391.
- Powell D. M., 2009. Dryland Rivers: processes and forms. In: A.J. Parsons, A.D. Abrahams (eds.) *Geomorphology of Desert environments*. Springer Science+Business Media B.V.
- Prasad M. N. V. y de Oliveira Freitas H. M., 2003. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology* 6 (3): 285-321.
- Pyle G. G., Kamunde C. N., McDonald D. G., Wood C. M., 2003. Dietary sodium inhibits aqueous copper uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Experimental Biology* 206: 609-618.
- Quinn J. R., 1990. *Our Native Fishes: The Aquarium Hobbyist's Guide to Observing, Collecting, and Keeping Them*, The Countryman Press, Woodstock, VT, USA.
- Reddy K. R., D'Angelo E. M., DeBusk T. A., 1990. Oxygen transport through aquatic macrophytes: the role in wastewater treatment. *Journal of Env. Qual.* 19: 261-267.
- Reddy K. R., Reddy S. R., Reddy P. R., Subrahmanyam K, Subrahmanyam M.V.R., 1986. Effect of nitrogen and phosphorus uptake of finger millet. *Ind. J. Agron.* 31: 29-32.
- Ronchail J., 1995. Variabilidad interanual de las precipitaciones en Bolivia. *Bull. Inst. Fr. Études Andines* 24 (3): 369-378.
- Rose-Janes, N.G. y Playle, R.C., 2000. Protection by two complexing agents, thiosulphate and dissolved organic matter, against the physiological effects of silver nitrate to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in ion-poor water. *Aquat. Toxicol.* 51: 1–18.
- Sagrario M. A. G., Jeppesen E., Goma J., Sondergaard M., Jensen J. P., Lauridsen T., Landkildehus F., 2005. Does high nitrogen loading prevent clear-water conditions in shallow lakes at moderately high phosphorus concentrations? *Freshwater Biology* 50: 27-41.
- Sánchez-Galván G., Monroy O., Gómez J., Olguín Eugenia J., 2008. Assessment of the Hyperaccumulating Lead Capacity of *Salvinia minima* Using Bioadsorption and Intracellular Accumulation Factors. *Water Air Soil Pollut* 194: 77–90.
- Santore R. C., Di Toro D., Paquin P. R., Allen H. E., Meyer J. S., 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals 2. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and *Daphnia*. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 2397–2402.
- Santore R. C., Mathew R., Paquin P. R., DiToro D., 2002 Application of the biotic ligand model to predicting zinc toxicity to rainbow trout, fathead minnow, and *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 133: 271–285.

- Santore, R.C. y Driscoll, C.T., 1995. The CHESS Model for Calculating Chemical Equilibria in Soils and Solutions. Chemical Equilibrium and Reaction Models, SSSA Special Publication 42. The Soil Society of America, American Society of Agronomy.
- Schecher W.D. y McAvoy D.C., 1994. MINEQL+: A Chemical Equilibrium Program for Personal Computers (Version 3.01). Environmental Research Software, Hallowell, ME, USA.
- Schenker J. y Harfmann D., 2010. Phytoremediation of Nutrient-Controlled Water using Duckweed and Water Fern. En: [http://www.skidmore.edu/academics/wri/harfmann\\_schenker.pdf](http://www.skidmore.edu/academics/wri/harfmann_schenker.pdf).
- Schlekat E.C, Van Genderen E., De Schamphelaere K.A.C., Antunes P.M.C., Rogevich E.C., Stubblefield W.A., 2010. Cross-species extrapolation of chronic nickel Biotic Ligand Model. *Sci. Total Environ.* 408: 6148-6157.
- Sen A. K. y Mondal N. G., 1990. Removal and uptake of Cu (II) by *Salvinia natans* from wastewater. *Water Air Soil Pollut.* 49: 1-6.
- Sherman R. E., Gloss S.P., Lion L.W., 1987. A Comparison of Toxicity Tests Conducted in the Laboratory and in Experimental Ponds Using Cadmium and the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*) *Water Res.* 21 (3): 317-323.
- Shilla D., Asaeda T., Fujino T., Sanderson B., 2006. Decomposition of dominant submerged macrophytes: implications for nutrient release in Myall Lake, NSW, Australia. *Wetlands Ecology and Management* 14: 427-433.
- Shu W.S., Ye Z.H., Lan C.Y., Zhang Z.Q., Wong M.H., 2002. Lead, zinc and copper accumulation and tolerance in populations of *Paspalum distichum* and *Cynodon dactylon*. *Environmental Pollution* 120: 445-453.
- Smith V., Tilman G., Nekola J., 1999. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution* 100: 179-196.
- Smolders A. J. P., Lock R. A. C., Van der Velde G., Medina Hoyos R. I., Roelofs J. G. M., 2003. Effects of Mining Activities on Heavy Metal Concentrations in Water, Sediment, and Macroinvertebrates in Different Reaches of the Pilcomayo River, South America. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44: 314-323.
- Smolders A.J.P., Hudson-Edwards K.A., Van der Velde G., Roelofs J.G.M., 2004. Controls on water chemistry of the Pilcomayo River (Bolivia, South-America) *Appl. Geochem.* 19: 1745-1758.
- Solbe J. F. de L. G., 1973. The toxicity of zinc sulphate to rainbow trout in very hard water. *Water Research* 8: 389-391.



- Song Z., Zheng Z., Li, J., Sun X., Wuang W., Xu, M., 2006. Seasonal and annual performance of a full-scale constructed wetland system for sewage treatment in China. *Ecological Engineering* 26: 272-282.
- Sooknah R.D. y Wilkie A.C., 2004. Nutrient removal by floating aquatic macrophytes cultured in anaerobically digested flushed dairy manure wastewater. *Ecol. Eng.*, 22: 27-42.
- Spry D.J. y Wood C.M., 1985. Ion flux rates, acid–base status, and blood gases in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, exposed to toxic zinc in natural soft water. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 42: 1332–1341.
- Srivasta A., Appenroth K. J., 1995. Interaction of EDTA and iron on the accumulation of Cd<sup>2+</sup> in Duckweeds (Lemnaceae). *J. Plant Physiol* 146: 173–176.
- Strickland J. y Parsons T. 1972. *A practical Handbook of Seawater Analysis*. Bull. No 167. (Ottawa: Fisheries Research Board).
- Stumm W. y Morgan J.J., 1970. *Aquatic Chemistry*. John Wiley & Sons, USA.
- Svecevičius G., 1999. Acute toxicity of zinc to common freshwater fishes of Lithuania. *Acta Zoologica Lituanica. Hydrobiologia* 9 (2): 114-118.
- Taiz L. y Zeiger E., 2010. *Plant Physiology*. 5ta ed. Sinauer Associates, Inc. 782 pp. En: <http://www.freebook4u.net/2011/02/plant-physiology-by-lincoln-taiz-and.html>
- Tao S, Xu S., Cao J., Dawson R., 2000. Bioavailability of apparent fulvic acid complexed copper to fish gills. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 64: 221–227.
- Tao, S., Liang, T., Liu, C. F., Xu, S. P., 1999. Uptake of copper by neon tetras (*Paracheirodon innesi*) in the presence and absence of particulate and humic matter. *Ecotoxicology* 8: 269-275.
- Tilman G. D., 1988. Dynamics and structure of plant communities. In: *Monographs in Population Biology* 26, Princeton University, Press, NJ 360 pp.
- Tilman, G.D., 1984. Plant dominance along an experimental nutrient gradient. *Ecology* 65: 1445–1453.
- US EPA, 1985. Ambient water quality criteria for copper-1984. EPA 440/5-84-031. Office of Water Regulations and Standards Criteria and Standards Division, Washington, DC, USA.
- US EPA, 2001. *Brownfield Technology Primer: Selecting and Using Phytoremediation for Site Cleanup*. En: <http://www.brownfieldstsc.org/pdfs/phytoremprimer.pdf>.

- US EPA, 2001. Update of Ambient Water Quality Criteria for Cadmium. EPA-822-R-01-001.
- US EPA, 2002. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition U.S. Environmental Protection Agency Office of Water Washington, DC.
- US EPA, 2007. Monitored Natural Attenuation of Inorganic Contaminants in Ground Water Volume 2. Assessment for Non-Radionuclides Including Arsenic, Cadmium, Chromium, Copper, Lead, Nickel, Nitrate, Perchlorate, and Selenium EPA/600/R-07/140.
- US EPA, 2012. Linking Restoration Practices to Water Quality Parameters. En: <http://water.epa.gov/type/watersheds/archives/chap3.cfm>.
- Van Genderen E., Gensemer R., Smith C., Santore R., Ryan A., 2007. Evaluation of the Biotic Ligand Model relative to other site-specific criteria derivation methods for copper in surface waters with elevated hardness. *Aquat. Toxicol.* 84: 279-291.
- Van T.K., Wheeler G.S., Center T.D., 1999. Competition between *Hydrilla verticillata* and *Vallisneria americana* as influenced by soil fertility. *Aquatic Botany* 62: 225–233.
- Vázquez M. D., López J., Carballeira A., 1999. Uptake of Heavy Metals to the Extracellular and Intracellular Compartments in Three Species of Aquatic Bryophyte *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44: 12-24.
- Vegliò F. y Beolchini F., 1997. Removal of metals by biosorption: a review. *Hidrometallurgy* 44: 301-316.
- Verboost P.M., Flik G., Lock R.A.C., Wendelaar Bonga S.E. 1987. Cadmium inhibition of Ca<sup>2+</sup> uptake in rainbow trout gills. *Am. J. Physiol.* 253: 216–221.
- Verboost P.M., Rooij J.V., Flik G., Lock R.A.C., Wendelaar Bonga S.E., 1989. The movement of cadmium through freshwater trout branchial epithelium and its interference with calcium transport. *J. Exp. Biol.* 145: 185–197.
- Vermaat J.E. y Hanif M.K., 1998. Performance of common duckweed species (Lemnaceae) and the waterfern *Azolla filliculoides* on different types of wastewater. *Water Research* 32: 2569–2576.
- Villar C.A., Gómez S.E., Bentos C.A., 2000. Lethal concentration of Cu in the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Cyprinodontiformes). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 65: 465-469.
- Wang C., Zhang S. H., Wang P. F., Qian J., Hou J., Zhang W. J., Lu J., 2009. Excess Zn alters the nutrient uptake and induces the antioxidative responses in submerged plant *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Chemosphere* 76: 938–945.

- Wang W.C. y Lewis M.A., 1997. Metal accumulation by aquatic macrophytes. In: *Plants for Environment Studies* (Edited by Wang WC, Gorsuch JW and Hughes JS) pp 367-416. Lewis Publishers, New York.
- Ward J.V., 1994. Ecology of alpine streams. *Freshwater Biology* 32: 277-294.
- Webb C.O., Gilbert G.S., Donoghue M.J., 2006. Phylodiversity dependent seedling mortality, size structure, and disease in a Bornean rain forest. *Ecology* 87: S123–S131.
- Webb, N.A. y Wood, C.M., 1998. Physiological analysis of the stress response associated with acute silver nitrate exposure in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 579–588.
- Weiner J., 1990. Asymmetric competition in plant populations. *Trends in Ecology Evolution* 5: 360–364.
- Weis J.S., Weis P., 2004. Metal uptake, transport and release by wetland plants: implications for phytoremediation and restoration. *Environment International* 30: 685-700.
- Wilde W.E. y Benemann J. R., 1993. Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. *Biotech. Adv.* 11: 781-812.
- Windom H.L., Byrd T., Smith R.G., Huan F., 1991. Inadequacy of NASQUAN data for assessing metal trends in the nation's rivers. *Environ Sci Technol.* 25:1137-1142.
- Wood C.M., Hogstrand C., Galvez F., Munger R.S., 1996. The physiology of waterborne silver toxicity in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The effects of ionic Ag. *Aquat. Toxicol.* 35: 93–109.
- Wright D. A. y Welbourn P., 2002. *Environmental Toxicology*, Cambridge University Press.
- Xing W., Huang W., Liu G., 2010. Effect of excess iron and copper on physiology of aquatic plant *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid. *Environmental Toxicology* 25: 103-112.
- Zar J.H., 1996. *Biostatistical analysis*. PrenticeHall, Inc. New Jersey 661 pp.
- Zayed A., Suvarnalatha G., Terry N., 1998. Phytoaccumulation of trace elements by wetlands plants: I Duckweed. *J. Environ. Qual.* 3:715–72.

# *Apéndice*

**Tabla 1.** Datos de área, caudal, sólidos totales disueltos y en suspensión e iones principales de 60 de los ríos más grandes del mundo según Gaillardet et al (1999). Resaltado y en *itálica* se muestran los datos del Río Pilcomayo.

<b>Cuenca</b>	<b>Área</b> 10 <sup>6</sup> km <sup>2</sup>	<b>Caudal</b> km <sup>3</sup> /año	<b>STD</b> mg/L	<b>STS</b> mg/L	<b>Na</b> μmol/L	<b>Ca</b> μmol/L	<b>K</b> μmol/L	<b>Mg</b> μmol/L	<b>Cl</b> μmol/L	<b>SO<sub>4</sub></b> μmol/l	<b>HCO<sub>3</sub></b> μmol/L
<b>Amazonas</b>	6112	6590	44	182	80	135	21	37	61	47	344
<b>Amur</b>	1,855	344	55	72	126	223	26	95	66	65	477
<b>Brahmaputra</b>	0,58	510	101	1060	91	350	100	156	31	104	951
<b>Cauverí</b>	0,088	21	396		2606	700	141	988	1429	333	2902
<b>Changjioang</b>	1808	928	221	520	222	973	36	292	151	164	2311
<b>Columbia</b>	0,669	236	115	64	217	450	28	206	86	115	1033
<b>Congo Zaire</b>	3,698	1200	35	32	96	56	43	59	37	15	258
<b>Danubio</b>	0,817	207	428	313	739	1473	51	1117	1509	660	3328
<b>Dnepr</b>	0,504	54	274	40	609	1105	26	424	489	326	2502
<b>Don</b>	0,42	28,9	829	80	6348	2073	26	1481	4200	2240	3295
<b>Ebro</b>	0,084	17,4	517	86	3283	1875	51	646	2071	1391	2159
<b>Elbe</b>	0,148	22,8	698	37	3717	2675	669	663	4971	1594	2164
<b>Fly</b>	0,06	141	116	816	101	533	11	72	3	28	1284
<b>Fraser</b>	0,22	112	92	175	126	443	18	148	69	85	841
<b>Ganges</b>	1,05	493	182	1100	417	580	67	267	143	83	1951
<b>Godavari</b>	0,313	105	193	1619	352	755	56	99	403	104	1721
<b>Hong He</b>	0,12	123	147	1057	483	388	38	333	237	119	1328
<b>Huanghe</b>	0,752	41	460	26900	2370	1175	105	848	1563	696	3361
<b>Indus</b>	0,916	90	302	2778	1370	958	112	374	931	436	2130

<b>Irrawady</b>	0,41	486	201	535	1304	250	51	247	514	52	1967
<b>Khatanga</b>	0,364	85,3	96	17	422	313	26	148	357	58	785
<b>Kikori</b>	0,0132	40,06	177		57	933	5	165	9	11	2049
<b>Kolima</b>	0,66	132	74	126	122	270	46	99	80	147	570
<b>Krishna</b>	0,259	30	317	2130	1848	688	77	556	1057	656	2049
<b>Kuskokwin</b>	0,123	59,9	145	116	96	605	20	226	19	147	1469
<b>Lena</b>	2,49	525	112	30	196	428	18	210	343	142	870
<b>Limpopo</b>	0,44	26	238	1269	896	483	118	506	406	54	2361
<b>Mackenzie</b>	1,787	308	209	134	330	890	26	337	226	369	1803
<b>Magdalena</b>	0,235	237	118	928	361	375	49	136	383	150	808
<b>Mahanadi</b>	0,132	66	147	909	443	260	38	391	883	156	998
<b>Mekong</b>	0,795	467	263	321	663	1001	48	367	448	343	2305
<b>Mississippi</b>	2,98	580	216	862	478	850	72	366	294	266	1902
<b>Murray Darling</b>	1,06	23,6	453	1271	4391	525	154	700	1886	396	1541
<b>N Dvina</b>	0,348	110	173	43	217	750	26	266	154	403	1361
<b>Narmada</b>	0,102	39	285	3071	1522	625		790	486	52	2869
<b>Nelson</b>	1,132	89,3	236		696	823	59	457	486	271	2115
<b>Nemanus</b>	0,0982	19,6	447	34	687	1735	26	926	791	626	4075
<b>Niger</b>	1,2	154,1	59	260	78	138	28	78	26	5	549
<b>Nile</b>	2,87	83	388	1400	2261	775	200	576	1257	542	2852
<b>Ob</b>	2,99	404	126	40	230	465	26	210	186	89	1279
<b>Odra</b>	0,112	18,3	529	7	2196	2150	544	535	3057	1052	2459
<b>Orinoco</b>	1,1	1135	25	132	64	65	17	27	25	24	164
<b>Panuco</b>	0,0663	17,3	601		1322	2750	103	1202	711	2333	2918
<b>Paraná</b>	2,783	568	86	139	231	173	94	86	185	21	690
<b>Pechora</b>	0,324	131	70	50	130	260	26	115	117	83	638

<b><i>Pilcomayo</i></b>	<b><i>0,2884</i></b>	<b><i>0,11</i></b>	<b><i>633,04</i></b>	<b><i>7572,61</i></b>	<b><i>3860</i></b>	<b><i>1660</i></b>	<b><i>157,6</i></b>	<b><i>1140</i></b>	<b><i>3190</i></b>	<b><i>2330</i></b>	
<b>Po</b>	0,07	46,7	354	330	730	1553	77	490	517	626	2918
<b>Purari</b>	0,0306	84,13	126	951	139	515	26	107	34	25	1328
<b>Rhine</b>	0,224	69,4	600		3957	2013	164	469	4943	771	2590
<b>Rhone</b>	0,0956	54	339	500	491	1770	54	267	640	479	2885
<b>Salween</b>	0,325	211	306		435	1150	26	658	571	10	3475
<b>Seine</b>	0,0786	12,9	493	44	922	2625	126	379	1100	580	4131
<b>Sepik</b>	0,0787	120	114	68	152	388	10	165	14	47	1205
<b>Shatt el Arab</b>	0,5413	45,8	400	2295	1348	1300	77	905	914	760	2951
<b>St. Lawrence</b>	1,02	337	168	12	239	750	35	247	214	146	1656
<b>Tocantins</b>	0,757	372	42	202	82	54	35	75	35	27	316
<b>Uruguay</b>	0,24	145	60	76	123	148	35	99	57	52	426
<b>Weser</b>	0,046	10,6	2463	31	24957	1400	1077	6214	35229	2448	2754
<b>Wisla</b>	0,198	32,5	583	79	2696	2250	26	535	4200	792	3115
<b>Xijiang</b>	0,437	363	161	190	117	810	31	198	91	85	1639
<b>Yenissei</b>	2,59	620	112	23	226	413	26	152	271	104	939
<b>Yukon</b>	0,849	200	183	286	113	795	31	295	31	233	1787
<b>Zambese</b>	1,33	103	80	194	235	265	49	169	186	31	525

---

**Tabla 2.** Caudales medios mensuales calculados a partir de los datos diarios de caudal, otorgados por la SSRRHH y disponibles desde el año 1961 al año 2008.

	<b>Ene</b>	<b>Feb</b>	<b>Mar</b>	<b>Abr</b>	<b>May</b>	<b>Jun</b>	<b>Jul</b>	<b>Ago</b>	<b>Sept</b>	<b>Oct</b>	<b>Nov</b>	<b>Dic</b>
<b>1961</b>	173,38	371,92	180,58	225,43	58,41	31,63	23,29	29,58	23,86	51,25	109,86	231,41
<b>1962</b>	321,38	367,28	341,12	144,7	70,16	37,93	47,61	42,51	14,16	8,58	18,3	268,25
<b>1963</b>	467,61	799,42	628,29	308,4	103,93	98	57,80	37,29	28,03	22	34,33	204,38
<b>1964</b>	265,03	354,17	448,87	192,4	131,61	83,56	45,80	31,19	23,03	13,64	48,4	151,70
<b>1965</b>	265,41	316,53	178,48	91,66	68,45	32,06	24,38	16,64	16,76	8,80	23,26	191,35
<b>1966</b>	318,29	276,67	225,96	129,43	79,32	32,4	19,87	12,16	7,5	22,87	27,33	275,64
<b>1967</b>	165,03	387,75	496,83	108,5	48,90	35,16	18,12	11,96	8,47	38,84	70,40	229,31
<b>1968</b>	337,29	1121,47	459,77	318,38	87,13	70,11	53,66	48,58	30,00	50,81	248,08	232,79
<b>1969</b>	328,12	458,96	130,60	77,41	50,50	37,19	27,72	20,41	10,03	15,97	38,86	181,5
<b>1970</b>	423,04	465,71	536,3	292,75	107,93	63,91	39,53	25,98	16,02	15,46	17,58	122,65
<b>1971</b>	322,85	795,70	512,47	195,49	66,86	49,44	24,01	17,65	14,49	18,98	88,07	207,16
<b>1972</b>	439,96	355,72	319,78	175,04	62,41	53,15	32,43	20,27	16,59	13,23	49,21	220,42
<b>1973</b>	398,79	394,25	457,17	251,26	99,87	126,39	38,04	27,13	14,12	15,45	37,36	109,30
<b>1974</b>	389,24	1192,65	692,87	596,45	111,77	72,53	49,94	37,74	21,22	24,46	15,41	132,05
<b>1975</b>	533,73	1084,33	487,22	211,16	127,60	64,36	46,78	34,98	28,73	36,17	49,94	182,88
<b>1976</b>	546,66	821,64	345,38	132,02	82,79	47,568	34,15	25,22	22,49	8,82	11,43	68,19
<b>1977</b>	250,01	484,33	697,84	226,43	102,80	49,25	29,84	21,06	19,69	34,46	130,91	281,51
<b>1978</b>	489,09	998,93	434,62	287,74	104,53	70,09	38,35	26,80	18,01	12,72	59,53	476,95
<b>1979</b>	1043,73	1062,67	876,86	414,23	133,86	100,97	79,76	53,25	33,02	35,50	104,83	340,79
<b>1980</b>	595,21	324,68	613,35	267,15	83,54	49,13	33,07	24,35	20,71	23,42	54,3	81,48
<b>1981</b>	655,37	985,59	700,90	399,559	145,41	87,29	65,89	60,83	43,44	37,20	103,375	307,30
<b>1982</b>	750,09	441,03	1220,07	390,79	146,33	84,32	66,51	46,08	42,48	60,61	83,56	159,96
<b>1983</b>	183,98	199,92	134,14	85,07	73,16	45,04	29,40	22,57	13,75	14,32	29,421	101,68
<b>1984</b>	900,64	1432,03	1908,25	645,41	154,65	109,83	67,75	59,35	34,87	69,28	339,41	382,46
<b>1985</b>	389,52	1685,09	464,28	351,71	132,71	77,01	58,66	41,8	38,29	30,43	391,01	496,40
<b>1986</b>	1070,7	467,09	1305,55	532,22	144,30	96,19	72,72	55,76	38,64	45,29	77,27	512,44
<b>1987</b>	1364,43	417,59	227,09	168,20	125,57	67,16	45,25	33,06	24,72	51,08	98,53	128,62



	<b>Ene</b>	<b>Feb</b>	<b>Mar</b>	<b>Abr</b>	<b>May</b>	<b>Jun</b>	<b>Jul</b>	<b>Ago</b>	<b>Sept</b>	<b>Oct</b>	<b>Nov</b>	<b>Dic</b>
<b>1988</b>	283,04	384,15	912,03	762,65	200,37	110,66	72,29	47,38	35,28	34,01	23,84	129,42
<b>1989</b>	377,57	192,25	251,05	346,36	107,00	65,21	44,83	26,45	20,71	27,34	37,36	194,41
<b>1990</b>	328,54	452,79	215,07	144,93	58,02	38,77	28,87	20,14	18,97	30,59	124,00	193,72
<b>1991</b>	640,71	459,83	747,28	248,661	74,04	48,70	36,89	25,57	26,57	21,21	78,10	65,60
<b>1992</b>	702,86	500,22	274,53	73,26	48,61	35,58	30,83	22,96	17,02	34,87	89,75	186,77
<b>1993</b>	477,07	237,02	438,56	162,63	62,57	36,335	30,08	25,20	22,24	25,29	57,52	240,17
<b>1994</b>	279,21	553,28	254,78	135,60	55,00	37,82	24,21	16,36	8,96	34,92	141,64	198,80
<b>1995</b>	486,17	379,47	621,23	182,78	72,07	38,30	27,88	20,92	16,87	9,68	37,67	106,15
<b>1996</b>	307,50	332,21	304,69	183,51	163,54	49,19	31,96	18,18	20,06	18,3	76,46	215,65
<b>1997</b>	485,04	1359,96	827,18	346,91	96,94	64,47	49,08	34,71	47,18	37,83	72,07	69,07
<b>1998</b>	155,20	214,36	263,35	189,56	69,32	36,11	27,52	24,02	9,48	17,69	194,35	151,88
<b>1999</b>	321,83	544,13	996,81	388,69	133,07	81,40	51,10	43,87	27,32	44,83	42,85	69,28
<b>2000</b>	445,99	531,49	744,25	217,87	95,89	56,94	37,45	28,25	18,48	26,57	50,06	170,28
<b>2001</b>	754,78	1206,24	779,07	266,88	114,64	74,28	56,74	39,09	31,66	47,90	83,12	135,06
<b>2002</b>	182,24	642,99	361,18	209,64	83,82	45,38	36,76	19,61	10,17	83,07	92,79	143,43
<b>2003</b>	617,54	318,78	696,36	198,07	67,63	40,14	28,04	23,32	9,30	15,36	15,10	241,60
<b>2004</b>	819,79	598,56	383,06	326,25	117,6	69,02	37,11	30,90	12,38	14,59	44,00	221,16
<b>2005</b>	352,50	846,42	319,87	323,92	87,05	49,62	29,91	18,12	18,22	32,92	44,65	168,98
<b>2006</b>	1082,29	976,65	608,14	599,77	140,89	74,54	45,59	28,79	15,57	38,70	116,97	268,15
<b>2007</b>	911,35	532,75	658,8	312,09	100,05	67,63	39,27	24,17	23,81	30,84	77,53	292,62
<b>2008</b>	1032,65	808,51	948,00	303,77	89,09	84,17	74,71	30,04	19,73	30,23	47,61	488,45

**Tabla 3.** Valores de los parámetros físico-químicos medidos en los muestreos realizados en Misión La Paz, Salta durante la estación seca. Datos provistos por la Comisión Trinacional para el Desarrollo de la cuenca del Río Pilcomayo.

	<b>Q</b> m <sup>3</sup> /s	<b>pH</b> UpH	<b>T°</b> °C	<b>STS</b> mg/L	<b>STD</b> mg/L	<b>Ca</b> mg/L	<b>Mg</b> mg/L	<b>SO4</b> mg/L	<b>Alc</b> mg/L CaCO <sub>3</sub>	<b>Cl</b> mg /L	<b>Na</b> mg/L	<b>K</b> mg/L	<b>COD</b> mg/L
<b>Sept-2011</b>	14,162	8,4	18,3	298	1010	95	-	266	146	224	136	9,7	-
<b>May-2011</b>	-	8,09	22,2	1182	584	49	-	212	108	106	134	6,8	-
<b>Ago-2010</b>	22,662	8,1	-	664	944	88	50	-	140	-	150	6	-
<b>Jun-2010</b>	46,924	8,07	14,3	1575	834	70,3	35,66	149,5	118,19	213,83	100	6,05	-
<b>May-2010</b>	74,67	7,31	16,7	-	-	44	9,4	231	94	45	100	6,8	5,8
<b>Sep-2009</b>	19,3	8,05	24,7	655	1114	88	52	393,4	135	191	159	7	10,8
<b>Ago-2009</b>	35,53	7,91	12,5	1312	800	65	40	280	140	156	89,2	6,4	-
<b>Jun-2009</b>	69,44	8,04	17,2	1748	669	81	33	256	114	124	100,9	6,7	-
<b>May-2009</b>	75,2	7,7	-	1637	517	66	33	207	110	101	70	4,3	4,4
<b>Oct-2008</b>	161,2	7,9	-	8181	1044	45	48	190	210	209	136	6	-
<b>Jul-2008</b>	37	8	-	448	1001	45	41	338	121	185	121	3,2	2,7
<b>May-2008</b>	102,5	7,91	19,2	982	564	76	30	250	91	95	74	5,4	-
<b>Ago-2007</b>	21,69	8,07	15,3	116	1054	101	41	371	136	239	207	7,1	-
<b>Jun-2007</b>	74,23	7,91	11,8	1400	800	86	38	-	-	-	120	4,8	-
<b>May-2007</b>	71,56	7,73	15,6	2044	894	77	31	-	-	-	85,5	4,7	-
<b>Ago-2005</b>	21,96	7,8	16,9	-	-	98,2	41	276	120	201	150	10	5,72
<b>Oct-2003</b>	6,45	7,8	25,8	380,5	-	150,2	37,5	399,7	124,2	243	194	12	-
<b>Ago-2003</b>	29,89	8,1	17,3	92	-	106	18,3	313	122	190	157	8	2,2

**Tabla 4.** Valores de los parámetros físico-químicos medidos en los muestreos realizados en Misión La Paz, Salta durante la estación húmeda. Datos provistos por la Comisión Trinacional para el Desarrollo de la cuenca del Río Pilcomayo.

	<b>Q</b> m <sup>3</sup> /s	<b>pH</b> UpH	<b>T°</b> °C	<b>STS</b> mg/L	<b>STD</b> mg/L	<b>Ca</b> mg/L	<b>Mg</b> mg/L	<b>SO<sub>4</sub></b> mg/L	<b>Alc</b> mg/L CaCO <sub>3</sub>	<b>Cl</b> mg/L	<b>Na</b> mg/L	<b>K</b> mg/L	<b>COD</b> mg/L
<b>Mar-2011</b>		7,59	23,7	30935	2725	42,67	49	301,6	101	6,07	38,79	5,19	-
<b>Dic-2010</b>	52,225	8,24	17,6	21579	809	69,33	44,32	125,7	83,75	118,97	80	8,37	-
<b>Feb-2010</b>	234,8	7,65	27,4	8999	430	64	-	139	96	20	32	6,4	-
<b>Ene-2010</b>	130,6	7,66	26,9	22016	518	41,9	-	120	113	23	59	5,2	-
<b>Dic-2009</b>	145,1	7,27	24,7	32354	518	55,7	20,7	196	145	32	50,5	5,1	-
<b>Nov-2009</b>	6,65	8,33	22,3	240	1168	91	-	376	104	268	131	9	-
<b>Mar-2009</b>	375,5	7,4	28,2	53960	248	41	10,9	59	127	36	32,7	4,7	-
<b>Feb-2009</b>	434,4	7,6	-	8982	252	44	12	78	182	30	29	3,3	-
<b>Feb-2008</b>	437,2	7,8	-	-	321	33	31	123	100	26	25	9,8	-
<b>Nov-2007</b>	40,63	7,58	-	16000	730	89	36	-	-	-	89	9,9	-
<b>Abr-2007</b>	124,3	7,81	17,7	504	486	60,1	21	-	-	-	48,3	3,2	-
<b>Feb-2007</b>	232,5	7,7	-	-	468	19	15	135	94	50	36	4,2	-
<b>Dic-2006</b>	136,7	7,6	-	-	358	29	14	184	90	47	18	4,7	-
<b>Abr-2004</b>	219,07	8,12	27,6	1878	170	30	3,4	65	57,6	25,6	25	3,5	7,8
<b>Mar-2004</b>	712,77	7,59	28	2669	436	74,1	9,5	165	87,3	67,8	60	5	4

**Tabla 5.** Valor del Nivel Guía para la Protección de la Biota Acuática (NGPBA) calculado para cada fecha de muestreo durante la estación seca.

	<b>Cu T.</b> mg/L	<b>Cu P.</b> ug/kg	<b>Cu D.</b> mg/L	<b>NGPBA</b> ≤ mg/L	<b>Zn T.</b> mg/L	<b>Zn P.</b> ug/kg	<b>Zn D.</b> mg/L	<b>NGPBA</b> ≤ mg/L	<b>Cd T.</b> mg/L	<b>Cd P.</b> ug/kg	<b>Cd D.</b> mg/L	<b>NGPBA</b> ≤ mg/L	<b>Ag T.</b> mg/L	<b>Ag P.</b> ug/kg	<b>Ag D.</b> mg/L	<b>NGPBA</b> ≤ mg/L
<b>Sep-2011</b>	0,01	43,62	0,002	-	0,16	449,66	0,03	-	0,001	3,02	0,0001	-	0,001	3,19	0,00005	0,00003
<b>May-2011</b>	0,03	21,31	0,0008	-	0,16	131,13	0,005	-	0,001	0,80	0,00005	-	0,001	0,80	0,00005	-
<b>Ago-2010</b>	0,007	10,24	0,0002	0,02	0,05	73,79	0,001	0,22	0,001	1,43	0,00005	0,0006	0,001	1,43	0,00005	-
<b>Jun-2010</b>	0,027	15,87	0,002	0,01	0,11	70,47	0,002	0,16	0,001	0,60	0,00005	0,0004	0,001	0,60	0,00005	-
<b>May-2010</b>	-	-	0,003	0,009	-	-	0,01	0,07	-	-	0,00005	0,0002	-	-	0,00005	-
<b>Sep-2009</b>	0,01	16,79	0,002	0,02	0,03	4,11	0,002	0,23	0,001	0,10	0,00005	0,0006	0,001	0,10	0,00005	-
<b>Ago-2009</b>	0,02	11,43	0,002	0,02	-	-	0,004	0,16	0,001	0,04	0,00005	0,0004	0,001	0,04	0,00005	-
<b>Jun-2009</b>	0,04	21,73	0,002	0,02	0,05	1,48	0,003	0,17	0,001	0,03	0,00005	0,0004	0,001	0,03	0,00005	-
<b>May-2009</b>	0,07	42,15	0,001	0,01	-	-	-	0,15	0,001	3,95	0,00005	0,0004	0,001	3,95	0,00005	-
<b>Oct-2008</b>	0,18	22,24	0,002	0,01	0,97	17,90	0,002	0,16	0,0001	-	0,0001	0,0004	0,0001	-	0,0001	-
<b>Jul-2008</b>	0,02	51,33	0,002	0,01	0,14	15,92	0,002	0,14	0,0017	0,17	0,0001	0,0004	0,0001	-	0,0001	-
<b>May-2008</b>	0,05	56,00	0,001	0,01	0,19	-	0,004	0,16	0,001	-	0,0001	0,0004	0,001	-	0,001	-
<b>Ago-2007</b>	0,03	232,75	0,003	0,02	0,09	5,37	0,005	0,22	0,0007	0,04	0,0001	0,0005	0,0004	0,02	0,0001	-
<b>Jun-2007</b>	0,03	20	0,002	0,02	0,12	224,20	0,003	0,19	0,001	1,78	0,0001	0,0005	0,001	1,78	0,0001	-
<b>May-2007</b>	0,07	33,26	0,002	0,01	0,26	-	0,001	0,16	0,007	-	0,0001	0,0004	0,002	-	0,0001	-
<b>Ago-2005</b>	0,02	-	0,006	0,02	0,07	-	-	0,22	0,0006	-	0,0001	0,0006	-	-	-	-
<b>Oct-2003</b>	0,02	35,47	0,006	0,02	0,20	98,82	0,02	0,29	0,00023	0,02	0,0002	0,0007	0,01	2,50	0,006	-
<b>Ago-2003</b>	0,02	192,39	0,003	0,02	0,11	40,27	0,007	0,18	0,00015	0,02	0,0001	0,0004	0,005	0,19	0,004	-

Las fechas en las que el cálculo del NGPBA no fue posible se debió a la ausencia de datos para calcular la dureza, ausencia de datos de STS ó de la concentración del metal total ó disuelto.

**Tabla 6.** Valor del Nivel Guía para la Protección de la Biota Acuática (NGPBA) calculado para cada fecha de muestreo durante la estación seca.

	<b>Cu T.</b>	<b>Cu P.</b>	<b>Cu D.</b>	<b>NGPBA</b> ≤	<b>Zn T.</b>	<b>Zn P.</b>	<b>Zn D.</b>	<b>NGPBA</b> ≤	<b>Cd T.</b>	<b>Cd P.</b>	<b>Cd D.</b>	<b>NGPBA</b> ≤	<b>Ag T.</b>	<b>Ag P.</b>	<b>Ag D.</b>	<b>NGPBA</b> ≤
	mg/L	ug/kg	mg/L	mg/L	mg/L	ug/kg	mg/L	mg/L	mg/L	ug/kg	mg/L	mg/L	mg/L	ug/kg	mg/L	mg/L
<b>Mar-2011</b>	0,19	6,33	0,001	-	0,97	31,35	0,003	-	0,006	0,19	0,0002	-	0,002	0,06	0,00005	0,00003
<b>Dic-2010</b>	0,16	7,18	0,003	-	0,65	30,26	0,002	-	0,005	0,23	0,00005	-	0,001	0,04	0,00005	-
<b>Feb-2010</b>	0,28	31,11	0,001	-	1,13	1731,29	0,003	-	0,007	10,61	0,00005	-	0,009	13,66	0,00005	-
<b>Ene-2010</b>	0,42	19,21	0,001	-	1,84	1387,19	0,02	-	0,01	9,10	0,00005	-	0,003	2,25	0,00005	-
<b>Dic-2009</b>	0,46	14,09	0,002	0,01	2,10	1197,36	0,009	0,11	0,02	10,26	0,00007	0,0003	0,005	2,83	0,00005	-
<b>Nov-2009</b>	-	-	0,004	-	-	-	0,004	-	0,001	0,58	0,00005	-	0,001	0,58	0,00005	-
<b>Mar-2009</b>	0,15	2,72	0,001	0,009	0,65	78,84	0,004	0,07	0,002	0,24	0,00005	0,0002	0,001	0,11	0,0001	-
<b>Feb-2009</b>	0,22	24,93	0,001	0,009	0,98	2169,64	0,01	0,07	0,0001	-	0,0001	0,0002	0,001	2,01	0,0001	-
<b>Feb-2008</b>	0,05	-	0,0009	0,01	0,18	179,22	0,003	0,10	0,002	1,63	0,0001	0,0003	0,0006	0,50	0,0001	-
<b>Nov-2007</b>	0,06	3,12	0,01	0,02	0,2	948,27	0,09	0,19	0,004	31,89	0,0003	0,0005	0,001	7,76	0,0001	-
<b>Abr-2007</b>	0,03	49,20	0,001	0,01	0,09	61,21	0,003	0,12	0,002	1,07	0,0001	0,0003	0,00008	-	0,00008	-
<b>Feb-2007</b>	0,04	-	0,001	0,007	0,16	76,32	0,001	0,05	0,002	1,12	0,0001	0,0001	0,0008	0,34	0,0001	-
<b>Dic-2006</b>	0,04	-	0,002	0,008	-	-	-	0,06	0,002	-	0,0001	0,0001	0,001	-	0,0001	-
<b>Abr-2004</b>	0,11	53,78	0,007	0,006	0,71	1816,03	0,02	0,04	0,0006	1,31	0,0001	0,0001	0,004	2,63	0,003	-
<b>Mar-2004</b>	0,11	41,03	0,001	0,01	0,48	5173,91	0,006	0,11	0,001	11,95	0,0001	0,0003	0,01	76,08	0,003	-

Las fechas en las que el cálculo del NGPBA no fue posible se debió a la ausencia de datos para calcular la dureza, ausencia de datos de STS ó de la concentración del metal total ó disuelto.