

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Departamento de Sanidad, Nutrición, Bromatología y
Toxicología

**RESPUESTA DE LA COMUNIDAD
BACTERIANA PRESENTE EN EL
EMBALSE LOS MOLINOS (CÓRDOBA,
ARGENTINA) EXPUESTA A PESTICIDAS**

Lic. Ariana ROSSEN

Director de Tesis: Ing. Luis HIGA

Supervisor de Tesis: Dr. Miguel D'Aquino - Profesor Emérito

2014

RESPUESTA DE LA COMUNIDAD BACTERIANA PRESENTE EN EL EMBALSE LOS MOLINOS (CÓRDOBA, ARGENTINA) EXPUESTA A PESTICIDAS

Tesis presentada para optar al Título de *Doctor de la Universidad de Buenos Aires*

Tesista: Lic. Ariana A. ROSSEN

Director de Tesis: Ing. Luis HIGA

Consejero de Estudios: Profesor Emérito Dr. Miguel D´AQUINO

Area de Investigación:

Higiene y Sanidad

Temática abordada:

Microbiología Ambiental

Calidad de agua

Lugares de trabajo experimental:

Laboratorio Experimental de Tecnologías Sustentables - LETS

Centro de Tecnología del Uso del Agua

Instituto Nacional del Agua

Cátedra de Higiene y Sanidad

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Universidad de Buenos Aires

Este trabajo fue financiado por Conicet/ Instituto Nacional del Agua con subsidio para investigación del INA del Fondo 10 - Gerencia de Programa y Proyectos.

Buenos Aires, 2014

Agradecimientos

A mi director de Tesis y Director del Centro de Tecnología del Uso del Agua del Instituto Nacional del Agua, Ing. Luis Higa por su dedicación y guía para poder llegar a término con este trabajo.

A mi Consejero de Estudios, Dr. Miguel D´Aquino de la FFyB por su cordialidad, asesoramiento y colaboración.

Muy especiales al Presidente del Instituto Nacional del Agua, Dr. Raul Lopardo por su apoyo permanente y compromiso para gestionar mi beca de Postgrado cofinanciada CONICET/INA, así como para autorizar el subsidio para mi investigación, sin los cuales esta Tesis hubiese sido imposible.

Al grupo encargado del monitoreo del embalse Los Molinos en Córdoba: Ing. Qca. Raquel Bazán y Qca. Nancy Larrosa de la FCEFYN e investigadoras de Instituto Superior de Recursos Hídricos - UNC, por aceptarme como parte del equipo, por brindarme su afecto y apoyo. A Fernando de la DIPAS, y a Marcelo, Claudio y Franco de Aguas Cordobesas que nos acompañaron en los monitoreos. A Guillermo Ceballos del Ente Intercomunal Los Molinos, por los invaluable contactos e información del uso de pesticidas en la zona.

Muy especiales al Dr. Leonardo Erijman y a la Dra. Eva Figuerola del Laboratorio de Ecología Microbiana del INGEBI – CONICET, por su colaboración, orientación y valiosos aportes al desarrollo de este trabajo. No sólo tuvieron la amabilidad de abrirme las puertas del laboratorio para que pueda realizar los análisis de DGGE y así incorporar el estudio de la estructura de las comunidades bacterianas a mi trabajo, sino que además tuvieron la gentileza de sentarse junto conmigo a analizar mis datos y sugerir ideas. Me ayudaron a ampliar mis conocimientos de ecología microbiana. Eva, gracias por tu amistad y por escucharme y darme tu contención en los momentos difíciles.

Al Lic. Daniel Calvo del INA por sus inmensa colaboración, participación y asistencia en el análisis estadístico de los datos.

Al Dr. Fernando Unrein, del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas de Chascomús (IIB-INTECH), por su asesoramiento en la técnica de Citometría de Flujo, en particular para el análisis de comunidades bacterianas de ambientes naturales, y a Guillermo, Técnico del Servicio de Citometría de la FCEyN-UBA, por la puesta a punto del método por citometría para el análisis de las muestras del embalse.

Al Ing. Agr. Marcelo Rittatore, asesor fitosanitario y productor, por su asesoramiento en el empleo de los pesticidas en campo en las zonas circundantes al embalse Los Molinos.

Al Dr. Alfredo Gallego por sus aportes a esta Tesis. A la Bioq. M. Susana Fortunato y la Bioq. Susana Rossi por su asesoramiento en las técnicas bacteriológicas en la Cátedra de Higiene y Sanidad- FFyB.

A mis compañeros del CIRSA-INA: No olvido mis primeros pasos en el monitoreo del embalse San Roque en Córdoba y todo lo que pude aprender de ustedes. Gracias por los buenos momentos, las aventuras y la amistad: Bioq. Marcia Ruiz, Lic. M. Inés Rodríguez, Dra. Alejandra Bustamante, Dra. Ana Laura Ruibal, Clarita, Eugenia y Florencia.

A mis padres y esposo por estar siempre a mi lado, alentándome, dándome las fuerzas necesarias para seguir, y superar la adversidad. Sin su ayuda, apoyo y sabios consejos estaría perdida, son mi gran estímulo para seguir creciendo y creyendo.

A todos aquellos que han hecho esto posible mis mas sincero y caluroso agradecimiento.

Ariana

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1-INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1- PARTICIPACIÓN DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS EN EL ECOSISTEMA ACUÁTICO	1
1.2- CONTAMINACIÓN DE LOS ECOSISTEMAS ACUÁTICOS	7
1.2.1 Manejo de los recursos hídricos en la Provincia de Córdoba. Caso de estudio: Cuenca del embalse Los Molinos	8
1.3- LOS HERBICIDAS COMO CONTAMINANTES AMBIENTALES	11
1.3.1 Atrazina	12
1.3.2 Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)	19
1.3.3 Legislación y Niveles guía de Atrazina y 2,4-D	27
1.3.4 Métodos de análisis de atrazina y de 2,4-D.	28
1.3.5 SoilFug-Modelo matemático de dispersión de pesticidas	28
1.4- OBJETIVOS	30
1.5- PLAN DEL TRABAJO DE TESIS	31

2- AREA DE ESTUDIO: CUENCA DEL EMBALSE LOS MOLINOS	32
2.1 Descripción de la cuenca del embalse los molinos	32
2.2 Características y calidad de las aguas del embalse Los Molinos	35
2.3 Suelo	36

3- MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1 Monitoreo del embalse Los Molinos	38
3.2 Evaluación de la exposición a atrazina y 2,4-D de las comunidades bacterianas del embalse Los Molinos	39

3.2.1. Ensayo de tolerancia a atrazina y 2,4-D de la comunidad bacteriana	40
<i>3.2.1.1 Determinación de la biomasa y la viabilidad bacteriana</i>	41
<i>3.2.1.2 Evaluación de la estructura genética de las comunidades bacterianas</i>	49
<i>3.2.1.3 Evaluación de la función metabólica de la comunidad bacteriana</i>	53
3.2.2 Evaluación de la capacidad de las comunidades bacterianas y de las bacterias tolerantes aisladas de degradar atrazina y 2,4-D	57
3.3 Soluciones y medios de cultivo	58
3.4 Compuestos químicos y parámetros de control	60
4- RESULTADOS	62
4.1 Determinación de la presencia de atrazina y 2,4-D en muestras de agua del embalse Los Molinos	62
4.2 Determinación de la biomasa y la viabilidad bacteriana en ensayos de exposición a atrazina y 2,4-D	62
4.2.1 Recuentos de bacterias heterótrofas cultivables	62
4.2.2 Comparación entre el número de bacterias heterótrofas cultivables viables y el de bacterias tolerantes	66
4.2.3 Secuenciación e identificación de los aislamientos de las bacterias tolerantes a atrazina y 2,4-D	67
4.2.4 Comparación entre el número de bacterias heterótrofas cultivables viables y el número de bacterias totales	68
4.2.5 Determinación de la viabilidad bacteriana mediante citometría de flujo	71
4.2 Evaluación de la estructura genética de las comunidades bacterianas	76
4.2.1 Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante - DGGE	76
4.3 Evaluación de la función metabólica de la comunidad bacteriana	84
4.3.1 Perfil fisiológico de la comunidad bacteriana	84
4.3.2 Evaluación del consumo de fuentes de carbono mediante Análisis de	98

Componentes Principales	
4.4 Evaluación de la capacidad de la comunidad bacteriana y de las bacterias tolerantes aisladas de degradar atrazina y 2,4-D	105
5-DISCUSIÓN	107
6-CONCLUSIONES	128
7- CONSIDERACIONES FINALES Y RECOMENDACIONES	135
RESUMEN	137
ANEXOS	139
I-ESTUDIO COMPLEMENTARIO:	
MODELACIÓN DE LA DISPERSION DE ATRAZINA Y 2,4-D EN LA CUENCA DEL EMBALSE LOS MOLINOS	139
II- ESTUDIO COMPLEMENTARIO:	
CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y SANITARIA DEL AGUA DEL EMBALSE LOS MOLINOS	162
III- FOTOGRAFÍAS DE LAS COLONIAS CRECIDAS EN PLACA DE PETRI Y CITOGRAMAS	191
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	196

1-INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 PARTICIPACIÓN DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS EN EL ECOSISTEMA ACUÁTICO

En los ambientes acuáticos las comunidades bacterianas cumplen un rol fundamental: (1) descomponen la materia orgánica y liberan los nutrientes minerales útiles para la producción primaria; (2) asimilan y reintroducen en la cadena alimentaria la materia orgánica disuelta; (3) participan en el reciclado de diferentes minerales y (4) son fuente de alimento para otros organismos que pertenecen a los niveles tróficos superiores (Azam *et al.*, 1983; Kemp *et al.*, 1993; Atlas y Bartha, 2002; Muylaert *et al.*, 2002; von Mering *et al.*, 2007; Davey, 2011).

Debido a la estrecha relación que existe entre la comunidad y los distintos procesos ecológicos que ocurren en el ambiente, resulta evidente que aquellos factores que regulan la abundancia, la distribución, la tasa de crecimiento y la respiración de estos organismos son, en gran medida, los mismos factores que regulan muchos de los procesos esenciales de los ecosistemas. El estudio de la comunidad bacteriana puede ofrecer importante información para comprender la dinámica y las múltiples interacciones que existen en los sistemas naturales (Cole, 1999; Boivin *et al.*, 2002; Allison y Martiny, 2008).

Este reconocimiento del carácter esencial que tiene la participación de las bacterias en el ambiente es relativamente reciente ya que por mucho tiempo se consideró que las bacterias eran resistentes, resilientes y funcionalmente redundantes. Se entiende que la comunidad bacteriana es resistente si se mantiene invariable en el tiempo respecto a su estado original a pesar de los cambios o disturbios ocurridos en el medio. Es resiliente cuando frente a disturbios o alteraciones ambientales cambia la composición de la comunidad pero se recupera y retorna a su estado original rápidamente. Finalmente, se considera que presentan redundancia funcional si en respuesta a las nuevas condiciones ambientales asociadas a los disturbios cambia la composición de esas comunidades pero desempeñan el mismo rol metabólico de manera que los procesos dentro del ecosistema no se verán afectados. Sólo si la comunidad bacteriana resulta vulnerable al disturbio, modificando la composición y la dominancia las sus poblaciones bacterianas y presentando diferencias funcionales respecto a la comunidad original, los cambios son relevantes y significativos para los procesos naturales que ocurren en ese ecosistema (Blanck *et al.*, 1988; Días-Raviña y Bååth, 1996; Allison y Martiny, 2008; Baho, 2010).

En referencia al punto anterior se ha comprobado que las comunidades bacterianas responden frente a los disturbios ambientales y/o compuestos tóxicos modificando la abundancia relativa de las diferentes especies dentro de la comunidad reemplazando a los organismos más sensibles por especies más tolerantes, y/o alterando el funcionamiento de esas comunidades producto de la pérdida de la biodiversidad (Gamo y Shoji, 1999; Insam y Goberna, 2004; Ratcliff *et al.*, 2006; van Straalen y van Gestel, 2008; Ordoñez *et al.*, 2009). En este marco de estudio, diversos autores han propuesto que las comunidades sometidas a factores de estrés y con una baja diversidad están menos adaptadas para enfrentarse a futuras fluctuaciones ambientales comparado con comunidades bacterianas con mayor diversidad biológica (Atlas y Bartha, 2002). Por tanto desde el punto de vista del ecosistema, es importante evaluar en qué medida una comunidad que resulta tolerante a una determinada condición de estrés puede mantener sus funciones metabólicas en el ambiente impactado (Macnaughton *et al.*, 1999; Garland *et al.*, 2003; Vinebrooke *et al.*, 2004).

Es por lo expuesto que la evaluación de los cambios estructurales y funcionales de las comunidades bacterianas como respuesta a la exposición de sustancias tóxicas en el medio ambiente donde se desarrollan se ha incorporado como parte de los estudios ecotoxicológicos (Rutgers y Breure, 1999; Massieux *et al.*, 2004; Boivin, 2005).

Los estudios ecotoxicológicos contemplan la integración de los efectos de los contaminantes a través de todos los niveles de organización desde la escala molecular hasta las comunidades y ecosistemas (Boudou y Ribeyre, 1997; Garland, 1997; Atlas y Bartha, 2002; Posthuma *et al.*, 2008). Este nivel de aproximación ecosistémica en la evaluación de la toxicidad permite predecir los efectos de la contaminación a una escala de mayor complejidad ambiental con el objetivo de prevenir o remediar cualquier efecto de deterioro que pueda ser identificado en el ecosistema bajo estudio.

Como un primer abordaje de los estudios de comunidades bacterianas hay que evaluar el número de organismos presentes y su viabilidad.

La definición de viabilidad en los organismos procariontes no es simple y directa, de hecho se han descrito una gran variedad de estados intermedios entre viabilidad y mortalidad. Desde el punto de vista ecológico, al menos tres categorías pueden ser identificadas: las bacterias vivas y activas, las cuales participan y juegan un papel relevante en la producción de biomasa y en los procesos biogeoquímicos del ecosistema; las bacterias vivas pero no activas, las cuales se identifican como en dormancia o latencia,

las cuales no participan en la producción de biomasa pero tienen el potencial para hacerlo; y por último las bacterias “muertas”, las cuales si bien no participan funcionalmente en el reciclado de nutrientes, representan el aporte al sistema de materia orgánica. La discriminación entre estas categorías sigue siendo limitada e incluso confusa, ya que el término “activa” puede ser confundido con “viva”, así como “inactiva” puede confundirse con el estado “muerta” (Berney *et al.*, 2007; Falcioni *et al.*, 2008; Davey, 2011). En estos trabajos se ha señalado además que las bacterias pueden exhibir estados de injuria producto de haber sido expuestas a agentes estresores físicos o químicos, como luz UV, compuestos tóxicos, calor entre otros (Berney *et al.*, 2007; Kramer *et al.*, 2009; Davey, 2011).

Una definición de viabilidad, que prevaleció por largo tiempo debido a su practicidad, fue aportada por Postgate (1969) quien empleó el concepto de viabilidad para describir a las bacterias que presentaban la capacidad de multiplicarse cuando en su medio existían las condiciones óptimas para ello. Esta situación “ideal” no es la que abunda en la naturaleza y de hecho son pocas las poblaciones de bacterias que pueden hallarse viables en el sentido expuesto anteriormente. Es más, con el aporte de las tecnologías de última generación, los investigadores han podido comprobar que el grupo de bacterias que pueden proliferar en medios de cultivo en placa de Petri, representan tan sólo una pequeña fracción, menor al 1%, de la población total (Zengler, 2009; Davey, 2011).

Por lo expuesto, no caben dudas que la mejor manera de determinar la viabilidad bacteriana es mediante la detección directa. En los últimos años con el avance de métodos moleculares, marcadores celulares y nucleares, además de los nuevos equipamientos que permiten una mayor resolución, se han podido desarrollar diversos indicadores de viabilidad sin necesidad de emplear métodos de cultivo. Estos indicadores de viabilidad están basados mayoritariamente en el uso de moléculas fluorescentes que pueden ser detectadas mediante microscopía de epifluorescencia o citometría de flujo.

Así, la citometría de flujo se ha convertido en una de las herramientas más poderosas ya que permite evaluar parámetros celulares que no pueden ser estudiados con ninguna de las técnicas convencionales, tales como el recuento en placa o los ensayos bioquímicos (Gasol y del Giorgio, 2000; Bunthof, 2002; Müller y Davey, 2009). Una de las grandes ventajas que presenta esta metodología respecto de las técnicas clásicas, e incluso de métodos moleculares, es la posibilidad de medir múltiples parámetros de miles de células individuales en tan sólo un par de segundos (Davey y Kell, 1996; Andreatta *et*

al., 2001; Müller y Davey, 2009). De esta forma mediante la citometría de flujo se pueden obtener valores promedio de las poblaciones, evaluar su heterogeneidad e incluso identificar subpoblaciones, así como también enumerar y determinar las propiedades específicas de cada célula individual, tales como el contenido de ADN, proteínas y actividad enzimática (Gasol y del Giorgio, 2000; Berney *et al.*, 2007; Bouvier *et al.*, 2007; Lehtinen, 2007).

Otro aspecto de importancia para la caracterización de las comunidades bacterianas está relacionado con la composición genética. En virtud del desarrollo de métodos moleculares se han realizado importantes descubrimientos relacionados con la gran diversidad de especies y poblaciones que se encuentran en el ambiente. De hecho constituye uno de los principales objetivos de la ecología microbiana comprender cómo se estructura la comunidad en función de las especies presentes y las interacciones que ocurren entre ellas y con su medio fisicoquímico (Atlas y Bartha, 2002; Pernthaler y Amann, 2005).

Para el estudio de bacterias se ha implementado como método de rutina la técnica basada en el análisis de la secuencia del ARN de la subunidad 16S ribosomal (16S ARNr) donde los productos de amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se corren en una electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (PCR-DGGE). El patrón de bandas en el gel que se obtiene luego de la corrida electroforética ha sido empleado extensamente para estimar la composición bacteriana e incluso la filogenia de los microorganismos, además de determinar los filotipos dominantes en una muestra dada (Muyzer *et al.*, 1993; Ritchie *et al.*, 2000; Theron y Cloete, 2000; De Wever *et al.*, 2005).

Para facilitar la interpretación de los perfiles de bandas de los DGGE se utilizan diversos índices de diversidad como Shannon-Weaver, además de los índices de Dominancia y Riqueza, entendida esta última como el número de bandas detectadas en el gel. Este análisis constituye una herramienta esencial que permite estimar cuantitativamente la variabilidad biológica presente en muestras provenientes de diversos ambientes y sometidas a distintas condiciones fisicoquímicas (Heip *et al.*, 1998; Foley *et al.*, 2008). En relación a este último punto, el análisis por DGGE se ha utilizado en un gran número de estudios de comunidades bacterianas de muestras de suelos (Agnelli *et al.*, 2004; Zabaloy *et al.*, 2010), sedimentos (Sonthiphand y Neufeld, 2013), efluentes (Lozada *et al.*, 2007; Basile y Erijman, 2010), lagos (Lyautey *et al.*, 2005; Casamayor *et al.*,

2007), mares (Schauer *et al.*, 2003; Malmstrom *et al.*, 2007; Frias-Lopez *et al.*, 2008) e incluso en la sucesión y formación de biofilms (Araya *et al.*, 2003; Lyautey *et al.*, 2005; Moss *et al.*, 2006).

Un tercer aspecto relevante para caracterizar a las comunidades bacterianas esta vinculado con el estado metabólico y el rol funcional de las poblaciones naturales. Poder identificar los cambios funcionales de los microorganismos a nivel de comunidad permite obtener información más descriptiva y ecológicamente relevante acerca de la capacidad de adaptación metabólica y plasticidad genética de las bacterias (Preston-Mafham *et al.*, 2002).

Si bien la capacidad de diferentes bacterias cultivables de utilizar un gran espectro de sustratos como fuente de carbono y energía ha sido empleada hace ya varios años para caracterizar e identificar cultivos puros de bacterias (Konopka *et al.*, 1998), fueron los trabajos de Garland y Mills (1991) los primeros que propusieron utilizar la capacidad catabólica de toda la comunidad bacteriana como metodología válida para esa caracterización. El procedimiento propuesto para evaluar la respuesta metabólica consiste en la incubación de muestras ambientales (agua, suelo) en presencia de diversas fuentes de carbono. El consumo de cada una de ellas se evidencia mediante el cambio de color de un indicador redox adicionado a cada solución de fuentes de carbono. La reacción se basa en los cambios en el estado de óxido-reducción como producto de la respiración bacteriana, es decir de la liberación al medio de CO₂. Es así que este método permite el desarrollo de un perfil de consumo de fuentes de carbono, el cual ha recibido el nombre de perfil fisiológico de la comunidad (o en inglés *community-level physiological profiling* - CLPP) (Garland y Mills, 1991; Garland, 1996). A partir del mencionado trabajo una gran diversidad de publicaciones han destacado las ventajas del empleo del análisis de los perfiles de consumo de fuentes de carbono como herramienta que ofrece una gran cantidad de información sobre las respuestas metabólicas de las comunidades bacterianas en estudios espaciales, temporales e incluso a nivel de respuesta experimental (Preston-Mafham *et al.*, 2002; Boivin *et al.*, 2002, 2005; Miner *et al.*, 2005; Kamitani *et al.*, 2006).

Como ya se mencionó anteriormente, las bacterias responden a las perturbaciones ambientales de diferentes maneras, como por ejemplo cambios en las actividades metabólicas. En este sentido, diversos autores han propuesto emplear los cambios en los perfiles de utilización de fuentes de carbono para evaluar la respuesta de la comunidad

bacteriana frente a disturbios ambientales como la presencia de contaminantes (Garland, 1997; Rutgers y Breure, 1999; Boivin *et al.*, 2002; Massieux *et al.*, 2004; Kamitani *et al.*, 2006). La gran ventaja de estos ensayos es que son más rápidos para cuantificar, sensibles y ecológicamente más relevantes (Garland, 1997; 1999). De hecho, existe en el mercado un producto comercial presentado en microplacas (*EcoPlate™* y el *Biolog GN MicroPlate*) con diferentes fuentes de carbono que permite estandarizar el procedimiento de caracterización funcional tanto de muestras de bacterias puras como de comunidades bacterianas complejas (Biolog, Inc. Hayward, CA).

Tal como se mencionó al comienzo, los microorganismos participan de los procesos de autodepuración en ambientes naturales a partir de su habilidad para utilizar los contaminantes orgánicos como fuentes de carbono y/o nitrógeno, y de esta manera eliminarlos del ambiente e impedir su acumulación (Ford, 1994; Godoy *et al.*, 1999). Las bacterias pueden degradar los compuestos orgánicos hasta su mineralización, o bien degradarlos parcialmente. Es importante señalar que no siempre la ruptura molecular de un contaminante orgánico conlleva la pérdida de las propiedades tóxicas. Para ciertos compuestos, los intermediarios de la degradación pueden ser tan tóxicos o más que el compuesto original (Cupples *et al.*, 2004; Muller *et al.*, 2004). Un ejemplo claro de esto lo constituye la biodegradación del herbicida 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) cuyos intermediarios metabólicos principales son el 2,4-diclorofenol (2,4-DCF) y el 4-clorofenol (4-CF), compuestos que exhiben una alta toxicidad para las comunidades acuáticas y la salud del hombre (Daugherty y Karel, 1994; Zipper *et al.*, 1999; Bukowska, 2006).

En este sentido conocer la capacidad de los sistemas naturales de remover compuestos orgánicos contaminantes es de suma importancia ya que permite establecer criterios de impacto y evaluar la capacidad del sistema de eliminarlos y amortiguar el daño y los efectos adversos que puedan ocasionar en los niveles tróficos superiores (Godoy *et al.*, 1999; Massieux *et al.*, 2004; Zabaloy *et al.*, 2010).

Si bien, los estudios que contemplan el impacto de los contaminantes en las comunidades bacterianas de ambientes acuáticos y en sus interacciones tróficas constituyen un aporte esencial para comprender la magnitud de los efectos adversos sobre la salud e integridad del ecosistema, son aún escasos (Pérez *et al.*, 2007; Ntowa *et al.*, 2008).

1.2 CONTAMINACIÓN DE LOS ECOSISTEMAS ACUÁTICOS

El agua dulce es uno de los recursos naturales esenciales para la vida y se encuentra en la tierra en tan sólo un 2,5% del total de agua existente. De ese porcentaje sólo el 0,6% corresponde a aguas superficiales contenidas en lagos y ríos (ILEC, 2005). Como resultado del desarrollo tecnológico así como del crecimiento incesante de la población, la demanda de agua para los diferentes usos se incrementa de manera exponencial y en consecuencia la presión que se ejerce sobre los recursos hídricos es cada vez más intensa (Baron, 2003; Falkenmark, 2003). Para abastecer los requerimientos del hombre y sus actividades tanto en áreas urbanas, rurales como industriales se están sobreexplotando los recursos naturales, a la vez que una multiplicidad de contaminantes es liberada al ambiente deteriorando la calidad de los diversos ecosistemas (Meybeck, 1996; Emerton y Bos, 2004; UNEP, 2004; UNESCO, 2006).

Los contaminantes pueden ingresar a los ecosistemas acuáticos directamente a través de fuentes puntuales de descarga de efluentes domésticos e industriales, o bien pueden ingresar de manera indirecta a través de fuentes difusas como las generadas por el uso de agroquímicos en la agricultura y por las descargas de efluentes domésticos y cloacales sin tratamiento adecuado de los asentamientos dispersos, así como las provenientes de la ganadería extensiva (Reyna, 2005; Larrosa, 2006).

La contaminación por agroquímicos se caracteriza por ser generalmente intermitente y de carácter estacional asociada a los periodos de cultivo. Su ingreso a los diferentes cuerpos de agua ocurre mayoritariamente por el arrastre y la escorrentía producto de las precipitaciones y el riego (Carpenter *et al.*, 1998). La presencia en el ambiente de los pesticidas puede ser consecuencia no sólo de su liberación durante la aplicación en campo, sino también durante su producción y disposición final (Ntowa *et al.*, 2008). También la dispersión atmosférica durante la aplicación suma otra vía de incorporación de pesticidas a los cuerpos de agua.

Cabe destacar que la contaminación por fuentes difusas entre las que se cuenta el uso de agroquímicos representa actualmente la principal causa de contaminación del agua debido a la diversidad de compuestos que son arrastrados a los cuerpos de agua cuyo origen, control y detección resulta dificultosa comparado con las fuentes de contaminación puntual (Carpenter *et al.*, 1998; Baker y Hunchak-Kariouk, 2006). Es por ello que las buenas prácticas de gestión deben incorporar la prevención como estrategia de manejo para disminuir los efectos de la contaminación. En el caso de las actividades agrícolas, estas prácticas de gestión deben orientarse a disminuir los procesos de erosión

de lo suelos e implementar mejores prácticas para el uso controlado, eficiente y responsable de agroquímicos (Hang, 2002).

1.2.1 Manejo de los recursos hídricos en la Provincia de Córdoba. Caso de estudio:

Cuenca del embalse Los Molinos

En la provincia de Córdoba, el agua es un recurso natural escaso, limitante del desarrollo económico e íntimamente ligado a la calidad de vida de la sociedad y su ecosistema, de allí la importancia de las investigaciones vinculadas a la problemática hídrica y los factores que inciden en la calidad del recurso. Diversas publicaciones apuntan a la falta de políticas de protección ambiental coherentes y sostenidas que contribuyan a prevenir el deterioro acelerado que sufren las principales fuentes de agua superficial de la provincia como son los embalses (Calcagno *et al.*, 2000; Quirós, 2000; Cossavella, 2003; Bazán *et al.*, 2005). Un ejemplo emblemático de la región es el embalse San Roque, el cual se encuentra en la actualidad con un grado importante de contaminación, casi comparable al sistema de la cuenca Matanza-Riachuelo en Buenos Aires (Rodríguez *et al.*, 2002; Ruibal Conti *et al.*, 1999; 2006).

La provincia de Córdoba es una zona estratégica para el desarrollo del país, siendo uno de los principales centros de exportación y de negocios de Argentina con una economía especialmente orientada hacia la actividad primaria y a la provisión de las industrias de la alimentación (Romano, 2002). Es por esta razón que las políticas de manejo del agua debe ser el resultado de una adecuada planificación que considere los más variados aspectos del suministro, distribución, disponibilidad y uso, tanto en volumen como en calidad (Plan de Recursos Hídricos-Taller Provincial, 2007).

Ante la necesidad de crear un órgano para el manejo sustentable e integral del recurso hídrico en la provincia, se concretó la conformación del Consejo Hídrico Provincial (COHIPRO) mediante el Decreto 1544/04. Este Consejo fue creado como órgano consultivo y de coordinación, con injerencia en todos los aspectos de carácter global, estratégico e interjurisdiccional en materia de recursos hídricos. Una de las principales tareas realizadas por el Consejo fue el “Plan de Gestión de los Recursos Hídricos de la Provincia de Córdoba”, donde se identifican los principales problemas vinculados al uso y aprovechamiento del agua. Por un lado, se destaca el déficit en la provisión de agua potable a gran parte de la región y por otro, la necesidad de controlar y prevenir la contaminación de aguas superficiales y fuentes subterráneas debido al desarrollo de la actividad agropecuaria e industrial (Reyna, 2005).

Además del embalse San Roque, en la provincia se destaca el embalse Los Molinos, siendo ambos las únicas fuentes de abastecimiento de agua potable de la ciudad de Córdoba y sus alrededores, que en conjunto tienen una población de 3,3 millones de habitantes (INDEC. Censo Poblacional 2010). Este número de habitantes corresponde a casi el 41% de la población total de la provincia. Más aún, ambos embalses suministran agua para irrigación, energía hidroeléctrica y representan importantes sitios de recreación en donde además de las actividades náuticas, se realiza pesca deportiva (Bazán *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2002; Ruibal Conti *et al.*, 2006). Cada embalse se caracteriza por dar origen a un único río; el Suquía que deriva del embalse San Roque y el río Segundo o Xanaes que proviene del embalse Los Molinos, sobre los que se ubican sendas plantas potabilizadoras.

La Planta Potabilizadora Suquía provee de agua a la zona norte del río Suquía, aproximadamente al 70% de la población mencionada, mientras que la Planta Los Molinos abastece al 30% restante, ubicada en el sector sureste de la ciudad (Cossavella, 2003; Aguas Cordobesas. Disponible en: <http://www.aguascordobesas.com.ar>).

Debido a que la calidad de las aguas del embalse San Roque se encuentra muy deteriorada es que se ha comenzado a extraer más agua del embalse Los Molinos, aumentando la presión sobre este recurso. Sumado a esto, se destaca el progresivo crecimiento urbano de las comunidades localizadas en sus márgenes como Potrero de Garay y Ciudad Parque Los Reartes. Cabe destacar que estas urbanizaciones carecen de conexión a redes cloacales, vertiendo sus efluentes domésticos a cámaras sépticas, sangrías o directamente al ecosistema sin ningún tratamiento. La llegada de estos efluentes domésticos-cloacales a las aguas del embalse no sólo deterioran la calidad acelerando los procesos de eutrofización por la presencia de nutrientes, sino que además comprometen la calidad sanitaria debido al aporte de microorganismos de origen fecal. Por otra parte, en la cuenca del embalse Los Molinos se desarrolla una importante actividad agropecuaria, donde el empleo frecuente de agroquímicos tales como los pesticidas contribuyen con la contaminación paulatina de sus aguas. La presencia de pesticidas en los cuerpos de agua constituye un riesgo no sólo por el impacto que pueden producir en los ecosistemas acuáticos, sino también en la salud de la población (Cossavella, 2003; Bazán *et al.*, 2004; Reyna, 2005; Bustamante *et al.*, 2007).

En los últimos años la intensificación de la agricultura llevó al reemplazo del sistema de labranza convencional por la siembra directa, donde el control mecánico de malezas ha sido sustituido por el control químico, lo cual se refleja en un incremento en el

uso de diversos agroquímicos. Los cultivos que se desarrollan anualmente en esta zona son: soja, maíz, sorgo y trigo (Ambrosino, 2000; Cossavella, 2003; SAGPyA, 2009), siendo la superficie total cultivada de aproximadamente 15.000 ha (INDEC. Censo Agropecuario 2008). Entre los compuestos fitosanitarios que se emplean para cada cultivo, se destacan el glifosato y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) para soja, mientras que para el maíz el principal agroquímico es atrazina. Los cultivos de sorgo y trigo emplean tanto atrazina como 2,4-D, entre otros pesticidas (CASAFE, 2010).

En la región bajo estudio se refleja una tendencia similar a la del resto del mercado nacional, donde se ha registrado que el 62% del total de pesticidas empleados corresponde a herbicidas, como los mencionados previamente (glifosato, atrazina y 2,4-D), con volúmenes aplicados que llegan a casi 10 millones de litros/año (CASAFE, 2010).

Con el objetivo de implementar un sistema de control de los pesticidas se promulgó la Ley Provincial N° 9164 sancionada en el año 2004 de Productos Químicos o Biológicos de Uso Agropecuario y su Decreto Reglamentario N° 132/05 (Ministerio de Producción y Trabajo. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Alimento), donde se especifica que para la aplicación de los productos químicos o biológicos de uso agropecuario se requerirá de una Receta Fitosanitaria expedida por un Asesor Fitosanitario. En dicha receta deben constar: las parcelas cultivadas en cada campo, tipo de cultivo, agroquímicos utilizados y métodos de aplicación. Cuando los lotes a tratar se encuentran en las cercanías de centros poblados, el usuario responsable y/o el Aplicador y/o el Asesor Fitosanitario debe notificar al Municipio o a la Comuna indicando los productos y dosis a utilizarse. El Municipio o Comuna son los responsables de aprobar o rechazar las fichas presentadas. Es importante señalar que el archivo de las Fichas Fitosanitarias no es obligatorio y no existe ningún control por parte de otras entidades. A pesar de ello, se han obtenido, a través de la Comuna de Villa Parque Los Reartes, una cantidad importante de Fichas Fitosanitarias que han permitido efectuar un diagnóstico preliminar del tipo de pesticidas, dosis y aplicaciones realizadas en los cultivos del perillago del embalse Los Molinos (ver Estudios Complementarios del ANEXO I)

Hasta la fecha no se cuenta con estudios de diagnóstico a escala local que permitan conocer como se dispersan, transforman y degradan los pesticidas utilizados en la cuenca Los Molinos. Con la expansión de la frontera agrícola y la necesidad de obtener mejores rendimientos en los cultivos, progresivamente se emplean mayores dosis y aplicaciones de pesticidas. Esta información puede corroborarse a partir de los datos publicados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación de la Nación

la cual anualmente realiza relevamientos de los tipos de cultivos, áreas cultivadas y rendimientos obtenidos por departamento en cada provincia del país. De allí surge que en los departamentos de Calamuchita y Santa María de la provincia de Córdoba donde se encuentra localizado el embalse Los Molinos, las áreas destinadas a agricultura, fundamentalmente a soja y maíz, se han incrementado entre un 80 a un 300% en la última década (campañas 2000 - 2010) (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentos. Censo Agropecuario. Disponible en: <http://magya.cba.gov.ar>).

De los pesticidas aplicados con mayor frecuencia y en mayor cantidad en la zona de la cuenca de Los Molinos se han seleccionado para este estudio los herbicidas atrazina y 2,4-D debido a que su nivel de persistencia y toxicidad representan un riesgo para la integridad del sistema acuático y la salud de hombre.

1.3 LOS HERBICIDAS COMO CONTAMINANTES AMBIENTALES

Los herbicidas están destinados a matar, regular o interrumpir el desarrollo de malezas que pueden amenazar, o alterar el desarrollo de los cultivos de interés agrícola (Hidalgo Ortiz, 1999).

No existe una única clasificación de herbicidas, ya que los mismos pueden ser agrupados según su naturaleza química, su mecanismo de acción, y el momento de aplicación. Cabe aclarar que un mismo herbicida puede ser clasificado en función de diferentes categorías. Por ejemplo: en función de su mecanismo de acción en relación con la estrategia elegida para el cultivo que se busca proteger se clasifican de la siguiente manera:

- **Selectivos**: aquellos que controlan un tipo particular de plaga, preservando el cultivo de interés económico.
- **Totales**: generalmente utilizados para limpieza de terrenos donde se controlan todas las especies existentes, sin discriminación.
- **Residuales**: persisten en el suelo controlando la aparición de malezas provenientes de semillas de especies anuales al impedir su germinación. Normalmente no son activos sobre especies perennes que rebrotan a partir de rizomas, bulbos o estolones.
- **Pre-emergentes**: son herbicidas que se aplican antes del desarrollo de los brotes del cultivo.
- **Post-emergentes**: son herbicidas que se aplican después del brote del cultivo.

- **Sistémicos**: se aplican sobre la planta, pero actúan a distancia, al ser traslocado hasta la raíz mediante el tejido vascular.
- **De contacto**: se aplican sobre la planta actuando localmente en la superficie, sin necesidad de ser traslocados.

Asimismo, los herbicidas pueden clasificarse en cuatro tipos diferentes en función de los procesos que alteran o inhiben:

- **Fotosíntesis** - bloquea la transferencia de electrones inhibiendo la fotosíntesis (por ejemplo: las triazinas), desacoplan la cadena de transporte de electrones que impiden la formación de ATP, alteran la biosíntesis de carotenoides.
- **Biosíntesis de metabolitos distintos a los carbohidratos** - alteran la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, y/o de la glutamina, inhiben la síntesis de lípidos.
- **Crecimiento vegetal** - alteran la elongación celular (por ejemplo: el 2,4-D), inhiben la síntesis de giberelina y/o inhiben la división celular.
- **Otros mecanismos de acción** - interrupción de la membrana celular, o de la actividad hormonal, inhibición de síntesis de pigmentos fotosintéticos.

Los herbicidas pueden clasificarse también por su forma de aplicación. De esta manera, se los diferencia entre:

- **Herbicidas aplicados por vía foliar**. La acción herbicida depende de la cantidad de producto retenido por las plantas, y por tanto, de la superficie de las hojas
- **Herbicidas aplicados al suelo**. La eficacia de los herbicidas aplicados al suelo depende de su grado de adsorción a las partículas coloidales. Estos herbicidas actúan protegiendo a las semillas de los cultivos de interés.

1.3.1 Atrazina

- **Producción, empleo y mecanismos de acción**

La atrazina o 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina, pertenece al grupo de las triazinas, siendo uno de los herbicidas más utilizados en el mundo con alrededor de 80.000 toneladas/año (Graymore *et al.*, 2001). En la Argentina, en los últimos años el uso de atrazina creció de 0,97 a 7,2 millones de litros/año; siendo actualmente el segundo herbicida más utilizado (Hang *et al.*, 2003; CASAFE, 2010).

Este herbicida se aplica como pre- y post-emergente en cultivos de maíz, sorgo y caña de azúcar para el control de malezas dicotiledóneas de hoja ancha y algunas

gramíneas (Yanze-Kontchou y Gschwind, 1994; Graymore *et al.*, 2001). Además, la atrazina se emplea en otros tipos de cultivo como plantaciones de pino y eucalipto (Graymore *et al.*, 2001). En Argentina, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria –SENASA- permite el uso de atrazina como principio activo y como formulados sin restricciones (SENASA, 2013).

La atrazina es un polvo incoloro y las dosis recomendadas por la fitoterapéutica oscilan entre 0,5 a 3 kg/ha considerando la atrazina como compuesto activo. Este herbicida posee una vida media de 2 a 6 meses. Sin embargo, la persistencia varia con la dosis utilizada, el tipo de suelo, la intensidad de las precipitaciones y la temperatura, entre otros factores (CASAFE, 2010; Helling, 2005).

El mecanismo de acción de la atrazina se basa en interferir en los procesos normales de la fotosíntesis inhibiendo el crecimiento de los organismos blanco. Este tipo de herbicidas es aplicado al suelo y absorbido por las raíces, luego transportado, vía xilema, a la parte aérea donde en los cloroplastos de las hojas el compuesto bloquea el transporte de electrones del Fotosistema II (Badii Zabeh *et al.*, 2005).

- **Estructura y propiedades fisicoquímicas**

Tanto la atrazina como los otros compuestos triazínicos, consiste en un anillo triazínico con nitrógenos (N) en las posiciones 1, 3 y 5; mientras que en la posición 2 presenta una molécula de cloro (Cl). En las posiciones 4 y 6 se ubican las cadenas de sustituyentes que le confieren a la molécula sus características y propiedades particulares. En la Figura 1-1, se presenta la estructura de la atrazina y en la Tabla 1-1 se presentan sus principales propiedades.

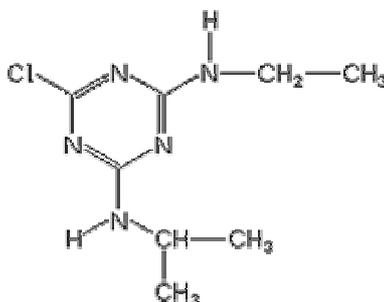


Figura 1-1. Estructura química de la atrazina

Tabla 1-1. Propiedades fisicoquímicas de la atrazina

PROPIEDADES	UNIDAD	VALOR
Masa molecular	g/mol	215,7
Punto de fusión	°C	175,8
Punto de ebullición	°C	205
Presión de vapor	mPa	0,04
Densidad relativa a 22 °C	g/mL	1,23
Solubilidad en agua a pH 7 y 22 °C	mg/L	33
Vida media por fotólisis en agua a 25 °C	días	335
Vida media por hidrólisis a 25 °C	días	30
pKa a 25 °C	pKa	1,68
Coefficiente de partición a 25 °C	log K _{ow}	2,5
Constante de la Ley de Henry a 25°C	atm m ³ /mol	2,96 x 10 ⁻⁹

• **Persistencia y degradación**

Casi todas las triazinas son muy estables en el suelo, siendo la tasa de degradación química altamente dependiente de la acidez del medio y de la presencia de sustancias como los compuestos húmicos que actuarían como catalizadores (Graymore *et al.*, 2001). La atrazina puede hidrolizarse rápidamente en medios ácidos o alcalinos. Por lo cual, presenta una moderada movilidad y es susceptible de ser arrastrada por precipitaciones, llegando a aguas superficiales y subterráneas (Douglas, 1993; Hidalgo Ortiz, 1999). Esto explica por que es uno de los herbicidas más detectados en el ambiente (Ddidigwu Nwani *et al.*, 2010; Pathak y Dikshit, 2012). Sin embargo, la atrazina es muy resistente a la hidrólisis en medios neutros (pH 7) y bajo esta condición se estima que puede persistir por tiempos prolongados. La volatilización o fotodegradación en aguas superficiales son despreciables para este compuesto (Pathak y Dikshit, 2011).

La degradación biológica es el proceso más importante para la remoción de atrazina ya que puede implicar su mineralización. Se han identificado un gran número de organismos responsables de su biodegradación dentro de los cuales se destacan los hongos y las bacterias aeróbicas y anaeróbicas. Muchos de estos organismos han sido hallados en suelos agrícolas contaminados con este compuesto (Topp *et al.*, 2000). Dentro de las principales bacterias aisladas se encuentran las que pertenecen a los géneros de *Alcaligenes*, *Nocardia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*,

Acinetobacter, *Rhizobium* y *Agrobacterium* (Mirgain *et al.*, 1993; Mandelbaum *et al.*, 1995; Struthers *et al.*, 1998; Seffernick *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2005; Shapir *et al.*, 2007).

Hasta la fecha se han identificado dos vías principales de degradación biológica, una de ellas mediante una dehalogenación hidrolítica donde el cloro se reemplaza por un grupo hidroxilo, dando lugar al compuesto hidroxiatrazina (HA) seguido de una catálisis de los grupos etilo e isopropilo, hasta llegar al ácido cianúrico. La segunda vía de degradación involucra dos submecanismos: dealquilación dando lugar a la dietilatrazina (DEA), o bien deaminación generando la deisopropilatrazina (DIA). Ambos submecanismos convergen en la formación del ácido cianúrico, que luego, por acción de una amidohidrolasa que rompe el anillo triazínico, se transforma en urea y finalmente se mineraliza en amonio (NH_4^+), dióxido de carbono (CO_2) y cloruro (Cl^-). En la Figura 1-2 se presentan las vías y los productos intermediarios de degradación de la atrazina.

Los intermediarios de degradación de la atrazina como HA, DEA y DIA son relativamente persistentes en suelo y su detección en agua superficial y subterránea genera preocupación ya que se desconocen los efectos adversos en los ecosistemas (Benki *et al.*, 1993; Yanze-Kontchou y Gschwind, 1994).

- **Toxicidad**

Los últimos trabajos publicados sostienen que la atrazina es un disruptor endocrino, comprobado a partir de diversos modelos animales vertebrados donde se observaron alteraciones en los niveles de hormonas que afectan la ovulación y la capacidad para reproducirse (Ward y Ballantine, 1985; Nudelman *et al.*, 2009). Asimismo, se ha verificado que la exposición a atrazina esta fuertemente asociada al desarrollo de cáncer de útero. En esta línea de trabajo utilizando un modelo murino, Birnbaum y Fenton (2003) han reportado que si la exposición a atrazina ocurre durante momentos críticos del desarrollo ontogénico del animal aumenta la probabilidad de padecer cáncer de mama una vez que llega a la edad adulta.

Si bien diversos estudios han demostrado que la atrazina no es genotóxica, aún se desconocen los mecanismos que participan en la inducción de tumores (Simpkins *et al.*, 2011; Gammon *et al.*, 2005; Severi-Aguiar y Silva-Zacarin, 2012).

Por otro lado, en diferentes especies de mamíferos se ha registrado que la exposición a la atrazina induce daño en el hígado, el riñón y el corazón (WHO, 2003; Beane Freeman *et al.*, 2011).

Recientemente la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC, 2013) modificó la clasificación de la atrazina ubicándolo dentro del Grupo 3. *“El compuesto (mezcla o circunstancia de exposición) no puede ser clasificable como carcinogénico para seres humanos. Esta categoría es usada más comúnmente para agentes, mezclas y circunstancias de exposición para la cual la evidencia de carcinogenicidad es inadecuada en seres humanos e inadecuada o limitada en animales experimentales”*. De todas maneras, diversos trabajos han comprobado que en humanos la exposición a atrazina estaría asociado a trastornos cardiovasculares, de los sistemas nervioso, inmune y endocrino (Smith *et al.*, 2005; Chevrier *et al.*, 2011; Pathak y Dikshit, 2011).

Debido a que la atrazina es un herbicida, no es de extrañar que todos los estudios toxicológicos realizados confirmen que los organismos más sensibles a la acción tóxica

sean las algas y una gran diversidad de plantas vasculares. En especial aquellas con raíces superficiales ya que la atrazina tiene una alta afinidad por la materia orgánica del suelo y por lo tanto permanece en las capas superficiales por mayor tiempo (Badii Zabeh *et al.*, 2005; SRHN, 2005). Sin embargo, se ha observado que los organismos pueden recuperarse de los efectos tóxicos de la atrazina siempre y cuando la duración de la exposición no sea demasiado prolongada y se verifique a concentraciones bajas (Solomon *et al.*, 1996).

Solomon y col. (1996) en base a los efectos tóxicos agudos de la atrazina en diferentes grupos de organismos acuáticos propusieron el siguiente ordenamiento en un sentido de sensibilidad decreciente: 1º) fitoplancton, 2º) macrófitas, 3º) bentos, 4º) zooplancton y 5º) peces. Como ejemplos de valores de fitotoxicidad puede destacarse el alga *Isochrysis galbana*, la cual presentó una concentración efectiva 50 (CE₅₀-10 días) de 100 µg/L (Mayer, 1987). En otro trabajo en algas *Selenastrum capricornutum* se determinó la inhibición del 50% de la fluorescencia de la clorofila-α para una concentración de 82 µg/L (Garrett, 2004). En perifiton se halló que los efectos adversos en el 50% de los individuos (CE₅₀-24 horas) correspondieron a una exposición a 17 µg/L asociado a la inhibición de la absorción de carbono (Larsen *et al.*, 1986)

Con respecto a las plantas vasculares, en estudios en los que se cuantificó el crecimiento de biomasa se observó que la especie más sensible fue *Elodea canadensis*, con un valor de CE₅₀ (28 días) igual a 13 µg/L, y la más resistente fue *Potamogeton perfoliatis*, con un valor de CE₅₀ (21 días) de 474 µg/L (Forney y Davis, 1981).

En lo que respecta a toxicidad aguda de la atrazina sobre los animales acuáticos, para los invertebrados como *Daphnia carinata* y *Acartia tonsa* los datos de toxicidad reportados expresados como la concentración efectiva 50 (CE₅₀) son de 24,5 mg/L y de 0,094 mg/L respectivamente (Phyu *et al.*, 2004).

En cuanto a toxicidad crónica de la atrazina, concentraciones iguales a 20 µg/L produjeron efectos adversos sobre la fauna acuática de agua dulce, incluyendo insectos y peces (Kungolos *et al.*, 1999; He *et al.*, 2012). En un trabajo de Tillitt y col., (2010) se han examinado los efectos reproductivos de atrazina en carpa cabezona (*Pimephales promelas*). Los autores demostraron que la atrazina afectó adultos de ambos sexos expuestos a concentraciones de 0,5; 5,0 y 50 µg/L de la atrazina durante 14 o 30 días. La producción total de huevos fue menor (19-39%) en todos los grupos expuestos a la atrazina en comparación con los controles. Si bien no se observaron anomalías en las

gónadas, la atrazina redujo la producción de huevos a través de la alteración de la maduración final de los ovocitos.

- **Atrazina como contaminante de ambientes acuáticos**

La atrazina es uno de los herbicidas más frecuentemente detectados en aguas subterráneas presentando niveles variables, desde 0,1 a 27 µg/L (Kolpin *et al.*, 2002; Diaz-Cruz; *et al.*, 2008). Como antecedentes a nivel mundial cabe citar que la atrazina ha sido registrada en aguas superficiales de diversos ambientes de los Estados Unidos, con valores de concentraciones que oscilaron alrededor de 20 µg/L (Struthers *et al.*, 1998). En un monitoreo de 20 cuencas hídricas localizadas en el centro oeste y sur de los Estados Unidos realizado entre los años 2007 a 2008 se detectaron en 18 de estos cuerpos de agua concentraciones frecuentes de 20 µg/L, en la mitad de los mismos se hallaron picos de 50 µg/L, y en algunos este valor superó los 100 µg/L (Wu *et al.*, 2009).

En lagos y arroyos canadienses han reportado la presencia de atrazina en concentraciones comprendidas entre 0,1 y 30,3 µg/L (Hamilton *et al.*, 1987). Así también se determinaron concentraciones medias de 0,4 y 10,5 µg/L para aguas superficiales y subterráneas que reciben aportes de áreas agrícolas en la región de Ontario (Health Canadá, 1993).

1.3.2 Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)

- **Producción, empleo y mecanismos de acción**

Los herbicidas fenoxiacéticos, al que pertenece el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), fueron introducidos en el año 1940 por lo cual constituyen el grupo más antiguo de herbicidas sintéticos empleados en la agricultura (Bejarano González, 2007). Su amplio uso se debe principalmente a su fuerte actividad herbicida y a su selectividad, que permite utilizar dosis pequeñas. Debido a su eficacia y bajo costo son muy utilizados en el control de las malezas de hoja ancha, o dicotiledóneas, y se aplican a las cosechas solos o combinados con otros herbicidas, lo que posibilita ampliar su campo de acción (Chinalia *et al.*, 2007).

Tanto el 2,4-D como otros herbicidas fenoxiacéticos se comercializan en forma de compuestos solubles en agua (sales de aminas), o en forma de ésteres como concentrados emulsionables, aunque también se utiliza el ácido libre. Las formulaciones realizadas en base a las sales de aminas no se adsorben tanto al suelo y en consecuencia presentan una alta movilidad, lo que aumenta su capacidad de contaminar aguas

superficiales y subterráneas. Las aminas más ampliamente utilizadas para la preparación de formulaciones son: trietanolamina, dietanolamina, trietilamina, trimetilamina, isopropilamina y 2-propanolamina. Las formulaciones que involucran a la forma éster son emulsiones preparadas con aceites que potencian la eficacia del herbicida, ya que este tipo de emulsión facilita la penetración del compuesto al cubrir la superficie de la cutícula favoreciendo la absorción a la planta. Estos últimos son los más utilizados debido a su mayor actividad herbicida, poder de penetración y baja presión de vapor (Dubus *et al.*, 2001; EPA, 2005).

Los herbicidas fenoxiacéticos son muy utilizados en el control selectivo y tratamiento de post-emergencia de especies dicotiledóneas en cultivos de especies gramíneas como maíz, arroz, trigo, avena, cebada, centeno y caña de azúcar, las cuales son resistentes a su acción tóxica. También se emplean en cultivos forestales, para controlar especies arbustivas y perennes, y en terrenos no cultivados como canchas de golf, así como para controlar malezas en jardines en casas particulares (EPA, 2005; Bukowska, 2006).

Normalmente se aplican en la parte aérea de las hojas o en la base de los árboles o arbustos a controlar, ya que la absorción del herbicida es efectiva tanto por las hojas como por las raíces. Los tratamientos se deben hacer cuando las plantas cultivadas tienen de 30 a 40 cm de altura y siempre en cultivos no sensibles. Según el Programa Internacional de Seguridad Química (*International Programme on Chemical Safety-IPCS*), para uso agrícola se aplican dosis del compuesto, de 0,2-2 kg/ha del ingrediente activo en su formulación ácida. En su forma éster se suele aplicar alrededor de 6 kg/ha.

El ácido 2,4-D es un herbicida *sistémico* debido a que se absorbe por las hojas o la raíz y se transporta por la savia a todo el cuerpo alcanzando los tejidos internos. Es considerado un herbicida hormonal ya que actúa mimetizando la acción de las auxinas. Estas hormonas, normalmente, estimulan la elongación de las células meristemáticas, la proliferación y la activación del metabolismo. De esta manera se sobrestimula la elongación celular en forma desmesurada generando malformaciones en los ápices, que finalmente conllevan a la muerte del vegetal (Chinalia *et al.*, 2007). Es por lo expuesto que este herbicida permite controlar muchas malezas dicotiledóneas ya que en estas plantas el ápice de crecimiento está desprotegido frente a la acción del herbicida (Dayan *et al.*, 2010).

• **Estructura y propiedades fisicoquímicas**

Los herbicidas fenoxiacéticos son compuestos de color blanco o incoloros, relativamente polares y fácilmente ionizables, que presentan baja volatilidad y se hidrolizan lentamente. En la Figura 1-3 se presenta la estructura química del 2,4-D. Las principales características físico-químicas de este herbicida se muestran en la Tabla 1-2.

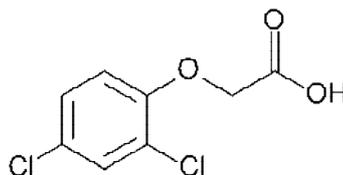


Figura 1-3. Estructura química del 2,4-D

Tabla 1-2. Propiedades fisicoquímicas del 2,4-D

PROPIEDADES	UNIDAD	VALOR
Masa molecular	g/mol	221
Punto de fusión	°C	140
Punto de ebullición (101 Kpa)	°C	160
Presión de vapor a 20 °C	mPa	1,1 x 10 ⁻²
Densidad relativa a 25 °C	g/mL	1,42
Vida media por fotólisis en agua a 25 °C	días	13
Vida media por hidrólisis a 25 °C	días	39
Solubilidad en agua a pH 7 y 22 °C	mg/L	890
pKa a 25 °C	pKa	2,64 - 3,31
Coefficiente de partición a 25 °C	log K _{ow}	2,81
Constante de la Ley de Henry a 25°C	atm m ³ /mol	8,6 x 10 ⁻⁶

• **Persistencia y degradación**

El ácido 2,4-D y sus productos de degradación y/o transformación son relativamente móviles en el medio ambiente y causan la contaminación de suelos, aguas superficiales y subterráneas. De esta forma, constituyen un riesgo potencial para la salud

humana a través de la exposición directa o mediante los residuos presentes en alimentos y en agua de bebida (EPA, 2005).

El tiempo de vida media en suelos se ha estimado entre 7 y 10 días (a 20 °C y 60% de humedad), mientras que en suelos ácidos puede llegar a 6 semanas (WHO, 2003). El 2,4-D puede fácilmente ser removido en suelos minerales mientras que permanece fuertemente adherido a aquellos suelos con alto contenido de materia orgánica (Gaultier *et al.*, 2006).

Aunque el anillo aromático en su estructura sugeriría estabilidad, tras su aplicación se degradan con facilidad. La degradación del compuesto puede ocurrir a través de mecanismos abióticos (hidrólisis, oxido-reducción) o mecanismos biológicos. Siendo este último el más relevante en términos ambientales. Esto es así ya que la presencia de grupos polares carboxilos e hidroxilos facilitan el ataque de las enzimas. La tasa de degradación biológica se ve afectada no sólo por la concentración del 2,4-D, sino también por la temperatura, la materia orgánica y la preexposición de los microorganismos al compuesto.

Se ha reportado que la vida media bajo condiciones aeróbicas es de 1 a varias semanas, mientras que en condiciones anaeróbicas puede ser de varias meses (WHO, 2003). Además, para el rango de pH entre 5 y 9, prevalece la forma ionizada del compuesto (de acuerdo a los valores de pKa), y en consecuencia estará en su forma más biodisponible.

El herbicida 2,4-D es de gran interés, no sólo por la amenaza que supone su presencia en el ambiente, sino también por los metabolitos que pueden generarse si el compuesto se degrada parcialmente. El principal intermediario metabólico de la degradación biológica aeróbica del 2,4-D es el 2,4-diclorofenol mientras que bajo condiciones de anaerobiosis los intermediarios metabólicos son el 4-clorofenol y, en menor proporción, el 2-clorofenol (Benoit y Barriuso, 1999). Ambos compuestos son más tóxicos y más persistentes que el 2,4-D. En las Figura 1-4 y 1-5 se esquematizan las dos vías metabólicas del 2,4-D a partir de una desoxigenación y de una dehalogenación, respectivamente.

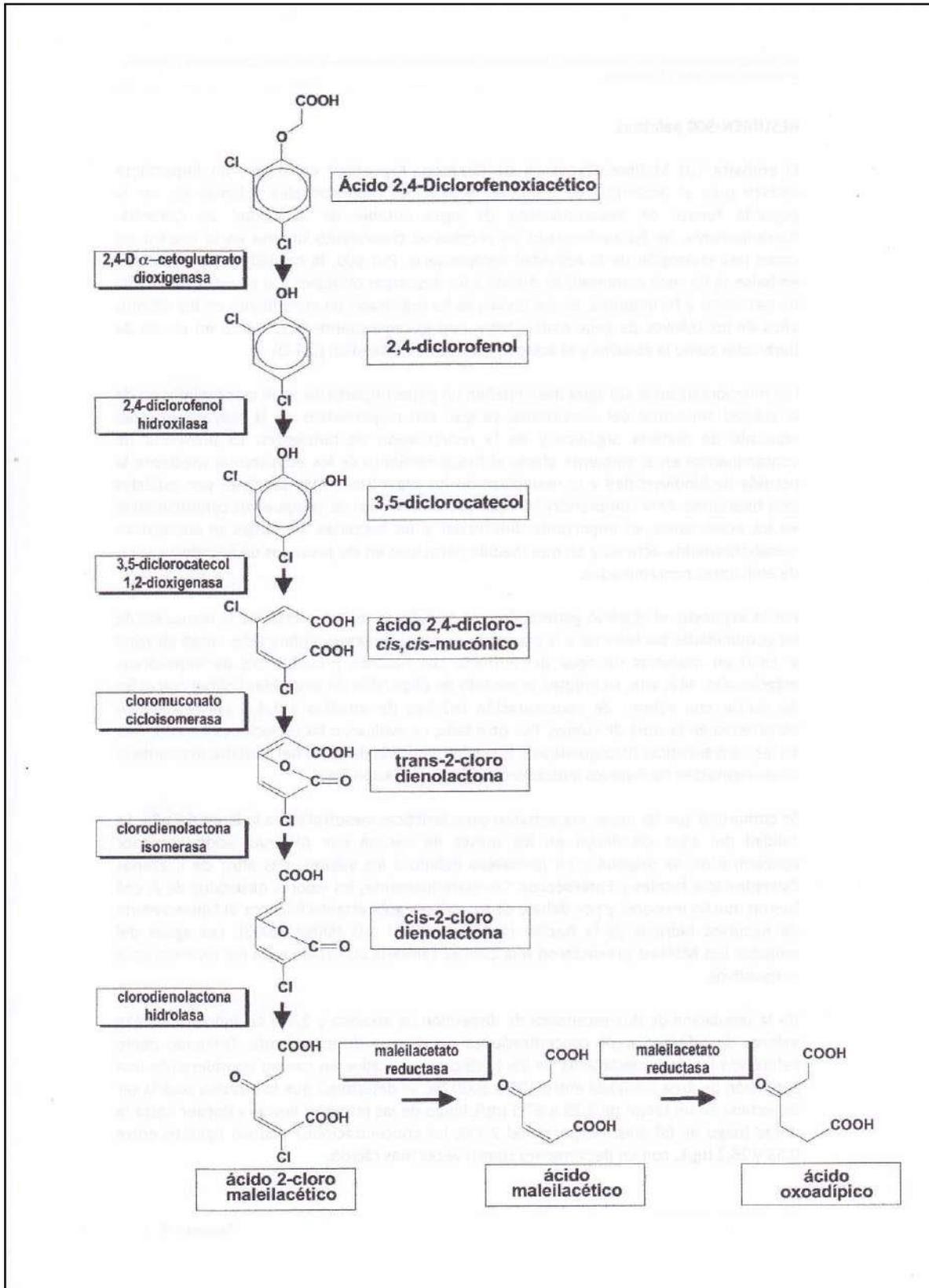


Figura 1-4. Vías de degradación biológica y formación de los intermediarios metabólicos del 2,4-D mediante una desoxigenación.

Esquema gentileza de Alfredo Gallego

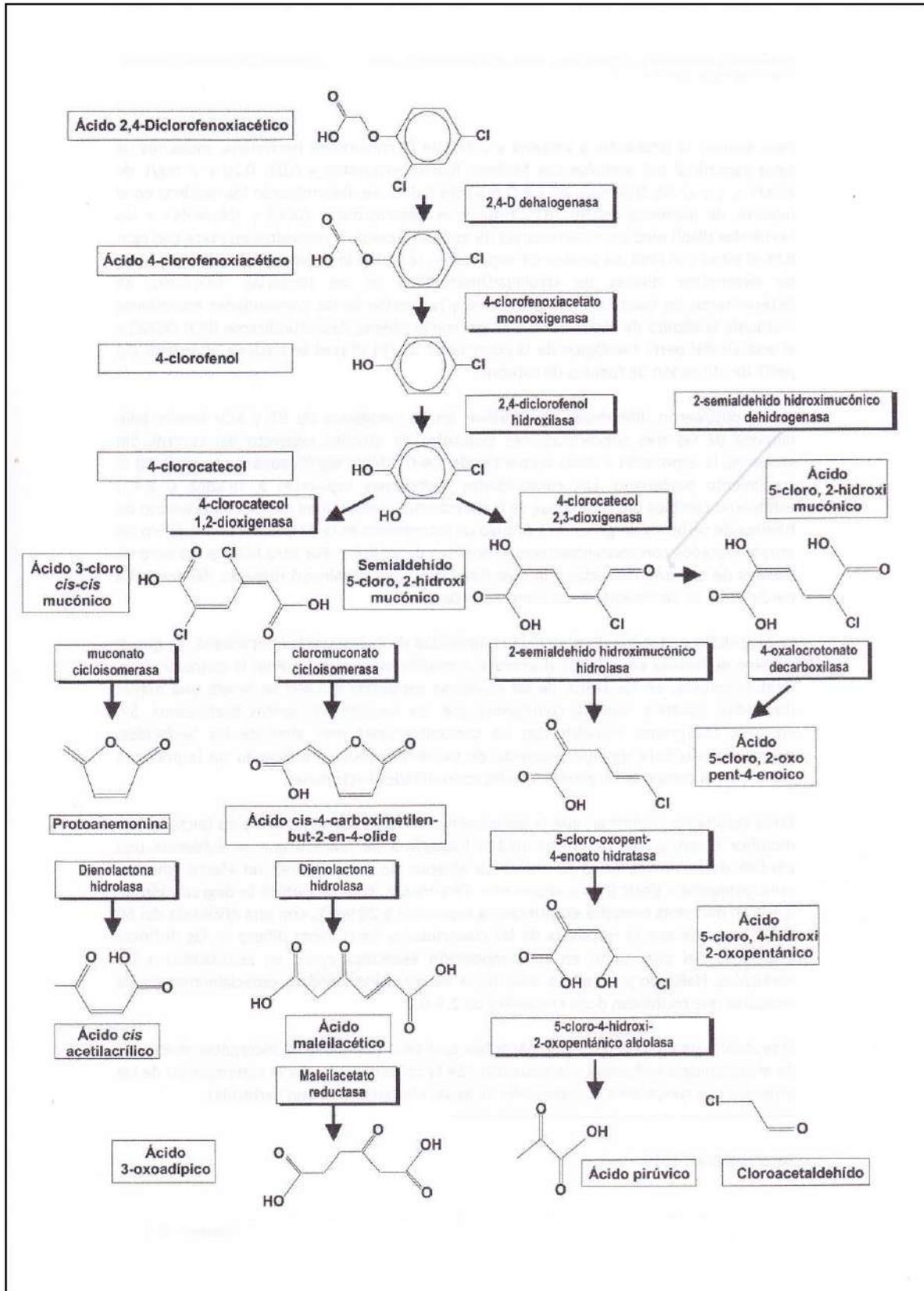


Figura 1-5. Vías de degradación biológica y formación de los intermediarios metabólicos del 2,4-D mediante una dehalogenación.

Esquema gentileza de Alfredo Gallego

- **Toxicidad**

Si bien el 2,4-D es un compuesto moderadamente tóxico según la clasificación de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, 2006), para la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer –IARC– pertenece a la categoría de carcinogénico clase 2B, es decir, posible compuesto carcinogénico para humanos (IARC, 2010). El mayor riesgo por exposición ocurre en aquellos trabajadores involucrados tanto en su producción como en su aplicación en campo, por la inhalación de polvo o por contacto dérmico. La población en general puede estar expuesta a través de la ingestión de alimentos o bebidas contaminadas, así como también por contacto dérmico con productos que contienen este herbicida.

La toxicidad en mamíferos está relacionada con la presencia de átomos de cloro en su estructura que pueden producir efectos adversos en diferentes procesos biológicos, por ejemplo cambios en la integridad y fluidez de la membrana celular (Chinalia, *et al.*, 2007). Tal como señalan los trabajos de Argese y col. (2005) y de Bukowaska (2006) la hidrofobicidad del anillo bencénico y los residuos clorados pueden migrar hacia la parte hidrofóbica de la membrana celular, debilitando las interacciones moleculares que la estabilizan. Estas alteraciones pueden manifestarse como inhibición de enzimas de la mitocondria (alterando la producción de energía y agotando las moléculas de ATP), del metabolismo de lípidos (peroxidación) y de la síntesis de proteínas, así como también aumentando la actividad de algunas enzimas de las células del músculo que se encargan del transporte de iones a través de las membranas.

Teixeira y col. (2004) en un estudio realizado con *Saccharomyces cerevisiae* propusieron que el mecanismo de acción más importante del 2,4-D es la estimulación de agentes oxidantes. Bajo este esquema, 2,4-D es el responsable de desencadenar una respuesta al estrés oxidativo que se inicia por la disrupción de la membrana mitocondrial, y que luego puede disparar una respuesta apoptótica mediante mecanismos dependientes de la familia de enzimas caspasas. Este mecanismo ya sugerido en un trabajo de Duchnowicz y Koter (2003) fue corroborado en otros estudios posteriores como el de Bukowaska y Hutnik (2006).

Si bien aún existe una gran controversia en relación a los resultados toxicológicos, diversos trabajos señalan a los herbicidas fenoxiacéticos y a sus intermediarios clorados como teratogénicos, mutagénicos, neurotóxicos, inmunosupresores, citotóxicos, hepatotóxicos y embriotóxicos en organismos acuáticos (Barnekow *et al.*, 2000; Madrigal-Bujadar *et al.*, 2001; Osaki *et al.*, 2001; Stürtz *et al.*, 2008).

En el hombre y otros animales superiores se ha registrado que el 2,4-D produce alteración en la expresión génica, disminuye la capacidad de la sangre para transportar oxígeno, altera la función normal del sistema hormonal, del sistema endocrino y del sistema nervioso (Stürtz *et al.*, 2008). Como ejemplo de datos toxicológicos en ratones, se observó que a los que se les suministró alimentos contaminados con 2,4-D con dosis de 5, 15, 45 o 90 mg/kg durante 3 meses, desarrollaban lesiones renales en ambos sexos para todas las concentraciones ensayadas (WHO, 2003).

El 2,4-D disminuyó además el crecimiento y la capacidad de fijar nitrógeno de las bacterias *Rizobium* sp. que se encuentran en las raíces de leguminosas (Rosales Conrado, 2005). En ensayo realizados con algas de la especie *Scenedesmus quadricauda* expuestas a concentraciones bajas dentro del rango 0,02 a 2 mg/L no mostraron efectos tóxicos, incluso estimuló en crecimiento, fotosíntesis y producción de clorofila- α . Sin embargo, cuando la concentración se elevó a 20 mg/L se obtuvo una inhibición significativa de los tres parámetros mencionados. Concentraciones de 200 mg/L o más, inhibió completamente el desarrollo de las algas (Wong, 2000).

Los resultados obtenidos de bioensayos estandarizados de toxicidad que emplearon el microcrustáceo *Daphnia magna* y el rotífero *Brachionus calyciflorus* señalaron que la concentración efectiva 50 (CE₅₀) fue de 35,9 mg/L y 0,65 mg/L respectivamente (SRHN, 2005). En un trabajo realizado con ciprinidos como la carpa (*Tinca tinca*) Sarikaya y col. (2002) determinaron la concentración letal (LC₅₀-96 horas) en 48 mg/L. En otra publicación de Sarikaya y Yilmaz (2003), realizado con la carpa (*Cyprinus carpio*) no sólo determinaron la dosis letal, sino que incluyeron el análisis de alteraciones comportamentales. Los autores hallaron que la dosis letal (LC₅₀) se obtuvo a 66 mg/L de 2,4-D. Aunque la necropsia de carpas sometidas a concentraciones más bajas reveló hemorragia extendida en su sistema digestivo y excretor, además de una dilatación del hígado. En relación a los cambios de comportamiento, los organismos tratados con 24 mg/L presentaron alteraciones como ansiedad, pérdida del balance, cambios en el nado, dificultad en la respiración, excreción excesiva de la mucosa, así como golpes en las paredes de las peceras.

- **El 2,4-D como contaminante de ambientes acuáticos**

Un estudio que midió los residuos de herbicidas presentes en muestras de cuerpos de agua adyacentes a predios agrícolas de la pradera canadiense, se encontró que el 2,4-D era el herbicida detectado con mayor frecuencia (teniendo en consideración que este

compuesto ha sido empleado en grandes cantidades en las praderas canadienses por más de 50 años). Además detectaron que los sedimentos del fondo constituyeron una fuente adicional de herbicidas cuando se resuspendieron en la columna de agua (Cessna y Elliott, 2004). Los autores de este estudio observaron que en ocasiones, las concentraciones máximas de herbicida excedían las normas para la vida acuática y para el agua de riego (100 µg/L). Otras publicaciones han destacado que el uso urbano del 2,4-D contribuyó a los volúmenes de residuos detectados a lo largo del río Rojo (Red river, Canada). En muestras de agua superficial de las lagunas adyacentes al río Rojo fueron detectadas concentraciones de 2,4-D que alcanzaron los 0,29 mg/L (Rawn *et al.*, 1999).

1.3.3 Legislación y Niveles guía de Atrazina y 2,4-D

Es interesante destacar que a pesar que la atrazina fue prohibida en la Unión Europea, sigue siendo utilizada ampliamente en países desarrollados como Estados Unidos y Canadá (Sass y Colangelo, 2006; Bejarano González, 2007), además de que tiene una amplia aceptación en todos los países de Latinoamérica, incluida la Argentina (CASAFE, 2010)

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) estableció el valor de referencia de 100 µg/L de exposición por día como valor para la protección de la salud en el hombre para atrazina (MHD, 2009). También la EPA estableció como nivel de contaminación máxima una concentración de 3 µg/L. En el año 2006 la EPA comenzó una etapa de re-evaluación de los criterios para definir los niveles guía para atrazina.

La Organización Mundial de la Salud (WHO, 2003) recomienda que para agua potable la concentración de 2,4-D debe hallarse por debajo de 0,1 mg/L. Por su parte la Agencia de Protección Ambiental de Los Estados Unidos (EPA) fijó ese mismo valor como nivel máximo permisible para agua potable. En una revisión y re-evaluación del 2,4-D en Canadá (PMRA, 2008) se permitió su empleo pero bajo estrictos controles donde se exigen registros exhaustivos de uso.

Canadá estableció niveles guía de calidad para agua potable considerando una concentración aceptable máxima para atrazina de 5 µg/L y para 2,4-D de 0,1 mg/L. Por otra parte, el nivel guía de calidad de agua para protección de la vida acuática para atrazina debe ser inferior a 1,6 µg/L (*Federal-Provincial-Territorial Committee on Health and the Environment- 2010*)

En Argentina los Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua para atrazina y 2,4-D fueron propuestos por la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación considerando

los diferentes usos del agua basado en los niveles propuestos por normativas internacionales (SRHN, 2003; 2005). En relación con la calidad del agua para consumo humano, los niveles se han fijado tomando como ingesta diaria tolerable $10 \mu\text{g}/(\text{kg masa corporal} \times \text{día})$ (WHO, 2003), que coincide con la dosis de referencia calculada por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, 2002). Los Niveles guía de calidad de agua establecen que en caso de utilizar el agua como fuente de agua potable con tratamiento convencional, la concentración de Atrazina y de 2,4-D deberían hallarse por debajo de 3 y $3,4 \mu\text{g}/\text{L}$, respectivamente. Estos valores también se establecen para protección de la biota acuática (SRHN, 2003; 2005).

1.3.4 Métodos de análisis de atrazina y de 2,4-D.

Los pesticidas pueden hallarse en las diferentes matrices ambientales (agua, suelo, alimentos, aire, etc.) y para su determinación se utilizan diversos métodos analíticos complejos como Extracción líquido-líquido (LLE), Extracción en fase sólida (SPE), Electroforesis capilar (CE); Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), Espectrometría de masas (MS), Cromatografía de gases (GC), Cromatografía de gases con detección de masa (GC-MS).

Cabe señalar aquí el desafío que representa poder determinar la dinámica de los pesticidas, teniendo en consideración que frecuentemente se miden en forma simultánea compuestos de muy diferentes polaridades, donde se requiere de muy bajos límites de detección, con una alta precisión y exactitud. Estos métodos presentan diferentes sensibilidades analíticas que pueden llevar a conclusiones erradas si no se tiene presente la complejidad de las muestras. Otro factor potencial de error puede estar vinculado a la oportunidad de la toma de muestra en relación con el momento en que el pesticida fue aplicado en campo. Por ambos factores es que algunas autores advierten que la no-detección de pesticidas en una dada muestra no implica necesariamente que tales pesticidas no puedan encontrarse en el ambiente (Ferrari *et al.*, 1997).

El desarrollo de nuevas estrategias para la evaluación de la contaminación del agua por fuentes difusas es clave para el desarrollo de planes de gestión y manejo de recursos naturales.

1.3.5 SoilFug-Modelo matemático de dispersión de pesticidas

Dado que la determinación de pesticidas en laboratorio es altamente costosa, pudiendo llegar a comprometer gran parte del presupuesto destinado al monitoreo ambiental, es que se requiere contar con otros instrumentos de bajo costo que permitan

complementar la información tomada en campo. Es por ello que se emplean modelos que permiten predecir el comportamiento de los pesticidas en el ambiente, ya que simulan el movimiento de los compuestos químicos intra- e inter- compartimentos (suelo, sedimentos, agua, biota y aire).

Los modelos se diseñan a partir de representaciones simplificadas que simulan procesos químicos, físicos y biológicos de forma que permiten identificar los mecanismos de degradación, remoción e incluso de dispersión de los compuestos en el ambiente (Natale *et al.*, 2002). La estimación de la distribución de concentraciones y masas de los pesticidas entre los compartimentos del suelo se realiza a partir del principio de Fugacidad propuesto por Mackay (1979). Este concepto de Fugacidad se basa en la tendencia de una sustancia química a migrar de una fase a otra.

En resumen los modelos matemáticos de dispersión permiten:

- Estimar las concentraciones ambientales de los compuestos contaminantes.
- Interpretar y comprender los procesos que regulan su distribución y destino final en el ambiente.
- Visualizar las vías de exposición.
- Identificar cada compartimento en el ambiente donde se distribuirá el contaminante
- Evaluar la eficiencia de medidas de mitigación.

Uno de los modelos más utilizados que se derivan del concepto de Fugacidad es el modelo SoilFug desarrollado por DiGuardo y col. (1994) en la Universidad de Trent de Canadá. Este modelo permite estimar las concentraciones esperables en suelo y aguas superficiales, a escala de cuenca hidrográfica. El aspecto más importante es que utiliza el enfoque de evento de lluvia, que es esencialmente el tiempo durante el cual el agente químico es potencialmente movilizado y redistribuido entre las fases. Dicho evento es regulado por un balance entre ingreso (precipitación) y egresos del sistema por procesos de degradación, volatilización, escorrentía superficial y percolado, entre otros. En la Figura 1-6 se presenta un diagrama de ingreso de datos y salida de resultados.

Este modelo considera que el pesticida se encuentra completamente mezclado en el estrato de suelo que corresponde a la superficie tratada y además considera la totalidad de la superficie de drenaje de la cuenca en donde se encuentra la parcela tratada. El mismo ha sido muy útil para predecir las concentraciones de pesticidas en

aguas superficiales de escorrentía a nivel de subcuencas. Teóricamente no hay obstáculos conceptuales para la aplicación de este tipo de modelos a una escala más amplia. En la práctica, la mayor dificultad tiene que ver con la heterogeneidad espacial de cuencas de gran tamaño (Barra *et al.*, 2000)

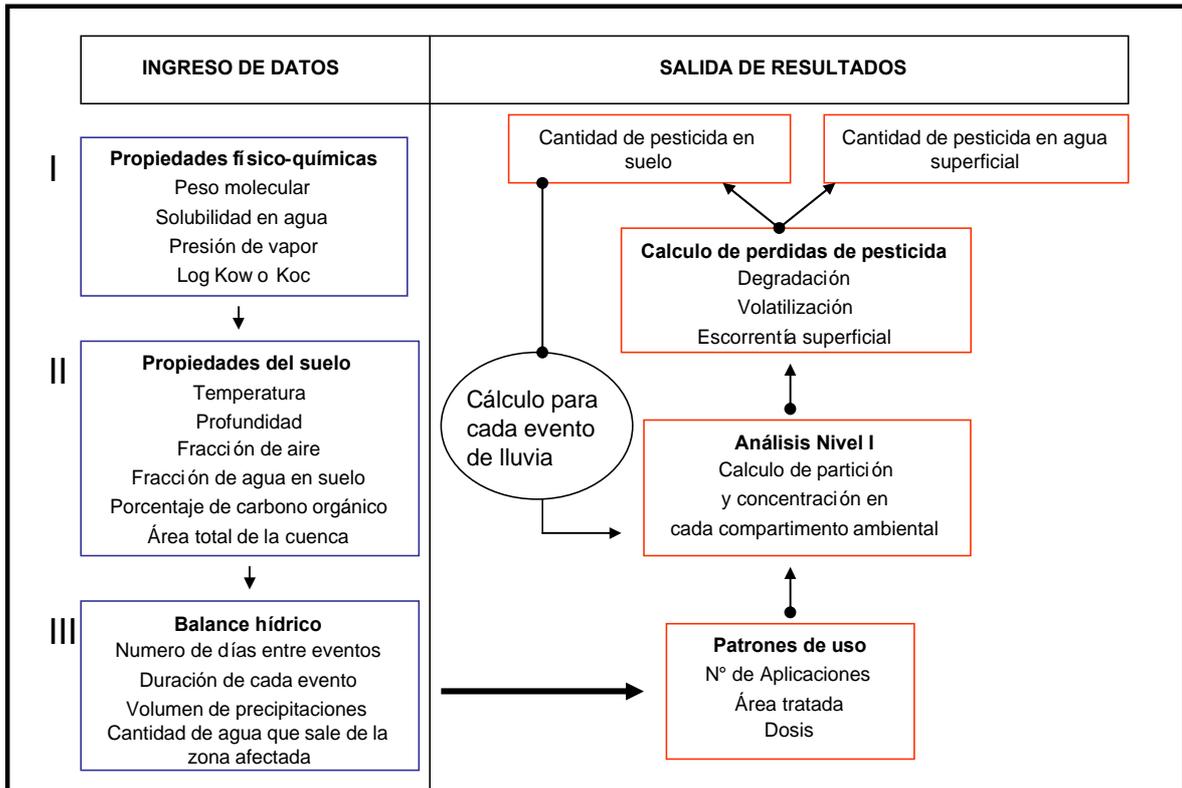


Figura 1-6. Diagrama conceptual del modelo SoilFug utilizado, con ingreso y salida de datos. Gráfico modificado de Barra (2002)

1.4 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la capacidad de las comunidades bacterianas de tolerar y degradar atrazina y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en agua del embalse Los Molinos (Córdoba, Argentina) como respuesta a la exposición a estos compuestos.

1.4.1 Objetivos Específicos

- Evaluar los cambios en la viabilidad, composición genética y función metabólica de la comunidad bacteriana debido a la exposición de atrazina y del 2,4-D en muestras de agua de Los Molinos en diferentes estaciones del año.

- Identificar las bacterias tolerantes a los pesticidas en estudio.
- Estudiar la capacidad degradativa de la comunidad bacteriana y las bacterias tolerantes aisladas para utilizar la atrazina y 2,4-D como única fuente de carbono y/o nitrógeno.

1.5 PLAN DEL TRABAJO DE TESIS

Para el logro de estos objetivos se evaluará:

- A) la biomasa y la viabilidad mediante microscopía de epifluorescencia, recuentos en placa de Petri y citometría de flujo.
- B) La composición genética de las comunidades bacterianas mediante la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (PCR-DGGE)
- C) la función de las comunidades bacterianas mediante el análisis del perfil metabólico de la comunidad (CLPP).
- D) la capacidad de biodegradar atrazina y 2,4-D mediante ensayos en sistemas *batch*

Complementariamente se incorpora la modelación de la dispersión de pesticidas como herramienta necesaria para la descripción de escenarios teóricos que permitan estimar las concentraciones de la atrazina y el 2,4-D en las diferentes matrices ambientales. Asimismo se presenta un análisis de los parámetros físicos y químicos determinados en los monitoreos estacionales del embalse Los Molinos a fin de caracterizar la calidad de las muestras de agua empleadas.

2- AREA DE ESTUDIO: CUENCA DEL EMBALSE LOS MOLINOS

2.1 Descripción de la cuenca del embalse Los Molinos

El embalse Los Molinos se encuentra ubicado en el Valle de Los Reartes, en el límite de los departamentos Santa María y Calamuchita; a 65 km al sudoeste de la ciudad capital de la Provincia de Córdoba. Las coordenadas geográficas del embalse son 31° 43' S, 64° 32' W. Su cuenca de alimentación se extiende al oeste por la Pampa y Cumbre de Achala hasta el Cerro Negro; al este, por los cordones de las Sierras Chicas (llamados Sierra del Tala y Cumbre del Hinojo); al norte por la Sierrita o Cordón de Santiago; al sur, una continuación de la cumbre de Achala la separa del Valle de Calamuchita.

La cuenca de aporte al embalse hasta la presa abarca una superficie de 978 km² y se encuentra dividida en cuatro subcuencas hidrográficas, correspondientes a los ríos Los Reartes, del Medio, San Pedro y Los Espinillos. Esta última es la de mayor superficie y representa casi el 40% de la superficie total de aporte. En las Figuras 2-1, 2-2 y 2-3 se presenta un mapa de la localización geográfica y las subcuencas hidrográficas, una imagen satelital y una foto del centro del embalse del embalse Los Molinos respectivamente.

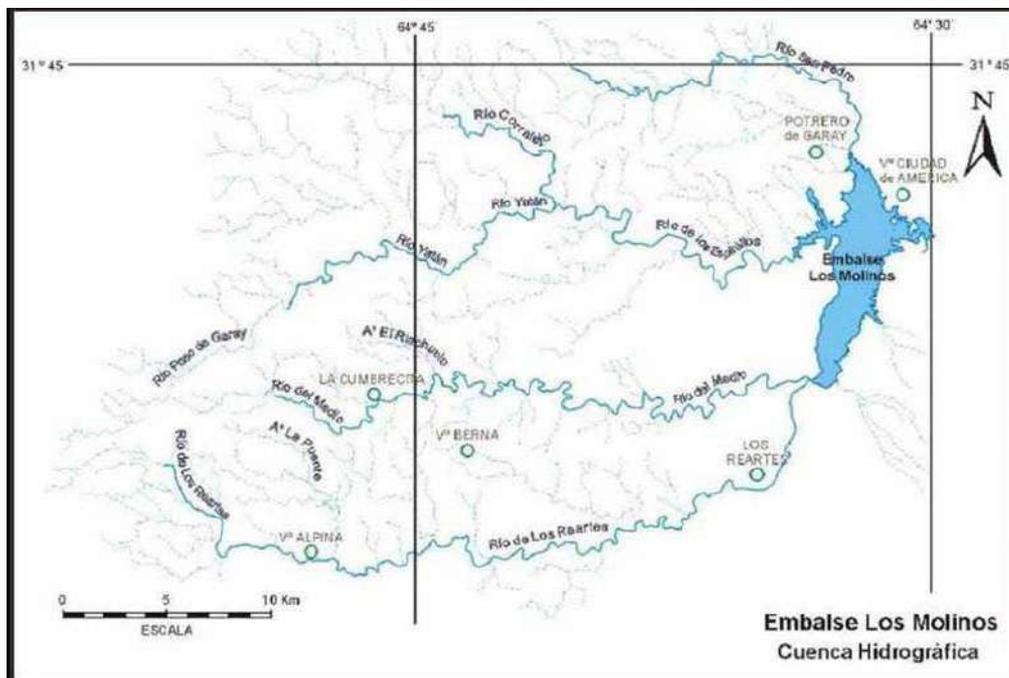


Figura 2-1. Ubicación geográfica del embalse Los Molinos y las subcuencas de los tributarios del embalse Los Molinos: río ríos Los Reartes, del Medio, San Pedro y Los Espinillos



Figura 2-2. Imagen satelital del embalse Los Molinos



Figura 2-3. Foto del embalse Los Molinos

En la tabla 2-1 se presentan las áreas de las subcuencas correspondientes a los ríos Los Reartes, del Medio, San Pedro y Los Espinillos y sus porcentajes de aporte a la cuenca del embalse. En la Figura 2-4 se aprecian fotografías de tramos de los ríos mencionados.

Tabla 2-1. Superficie y porcentaje de aporte de las subcuencas

SUBCUENCAS	CAUDALES PROMEDIOS ANUALES (1999-2009) (m ³ /s)	SUPERFICIE (Km ²)	% DE LA CUENCA TOTAL
Río Los Reartes	2,40	223,4	24,9
Río del Medio	1,62	131,0	14,7
Río Los Espinillos	4,13	339,6	38,0
Río San Pedro	0,70	96,0	10,7

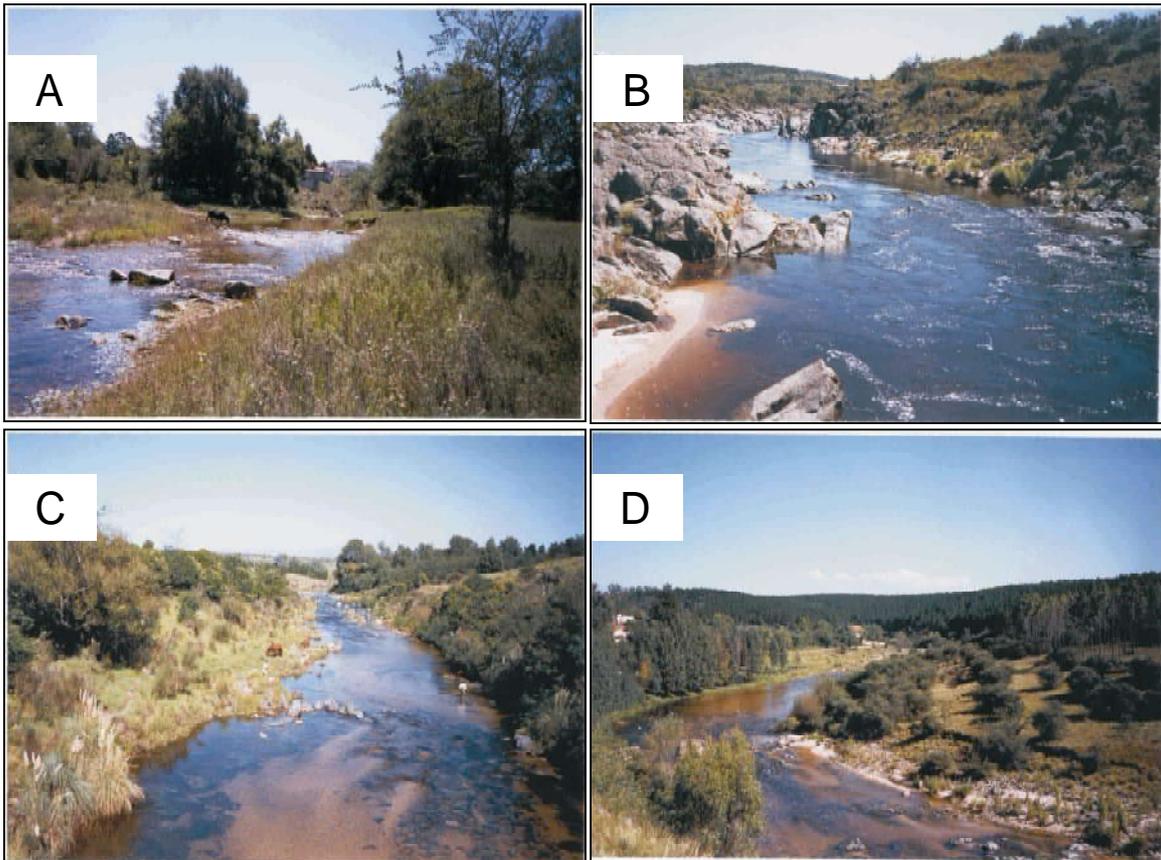


Figura 2-4. Vistas de los principales ríos que conforman la cuenca hidrográfica del embalse Los Molinos. A) Río San Pedro, B) Río Los Espinillos, C) Río del Medio y D) Río Los Reartes

La única descarga del embalse es el río Segundo, Xanaes, o también conocido como río Los Molinos, el cual cuenta con un módulo de aproximadamente $10 \text{ m}^3/\text{s}$, siendo la dirección del trayecto del río este-noreste sobre terreno llano. El embalse se encuentra a 765 m sobre el nivel del mar con un área superficial de $21,1 \text{ km}^2$ siendo la longitud máxima (N-S) de 13,5 km y el ancho máxima (E-O) de 3,50 km. El volumen a cota de vertedero es de 307 hm^3 . Su profundidad máxima es de alrededor de 50 m a nivel de la pared del Dique, la profundidad media es 16,3 m y el tiempo de residencia hidráulica es 1,02 año (Ambrosino, 2000).

La cuenca del embalse se encuentra bajo el dominio de un clima semiárido, con una gran variación espacio-temporal del régimen de precipitaciones anuales. Por lo cual se definen dos periodos bien marcados: Uno seco (abril-septiembre) y otro húmedo (octubre-marzo). El periodo seco de esta región se caracteriza por severas y persistentes sequías (Bustamante *et al.*, 2007). Mientras que durante el periodo húmedo se presentan frecuentes lluvias intensas de corta duración, muchas de las cuales generan crecientes repentinas en los ríos y arroyos serranos. Las precipitaciones medias anuales están en el orden de los 800 mm.

El clima en la zona de estudio es templado con temperaturas medias anuales que varían entre los 10 y 14 °C, debido a la orografía de la zona. La temperatura máxima media anual ronda entre los 14 y 20 °C, mientras que la mínima media anual fluctúa entre los 5 y 10 °C. Se han registrado valores de temperaturas medias extremas de 40 °C en verano y -6 °C en invierno.

La circulación de los vientos está condicionada por las características del relieve que provocan movimientos de aire descendente y corrientes en distintas direcciones. Los vientos predominantes provienen desde el norte y el sur.

2.2 Características y calidad de las aguas del embalse Los Molinos

El lago se caracteriza por ser del tipo *cálido monomítico* con estratificación de la columna de agua durante los meses de verano (Bonetto *et al.*, 1976; Cossavella, 2003). En los últimos veinte años se viene registrando cambios en la productividad del embalse con proliferaciones cada vez más frecuentes de algas verdes-azules o cianofíceas visibles en superficie (Donatti y Reartes, 1997; Rodríguez *et al.*, 2002; Cossavella, 2003), ocasionalmente se ha registrado crecimiento de algas dinoflagelados con predominio del

género *Ceratium* sp. (Di.P.A.S, 1999). Este progresivo incremento en la eutrofia esta asociado además con el agotamiento del oxígeno hipolimnético, el incremento de nutrientes cerca del fondo.

Debido a que la expansión urbanística que ha evidenciado la cuenca del embalse Los Molinos carece de un plan adecuado que contemple el tratamiento de los efluentes domésticos, las aguas residuales son eliminadas mediante cabinas sépticas o se descargan directamente al embalse, incrementando el impacto en la calidad de las aguas, tal como fue mencionado en la Introducción de esta Tesis.

Por otro lado, los agroquímicos utilizados en la zona contribuyen al deterioro de la calidad de las aguas que se evidencia en el embalse (Cossavella, 2003). Otros factores que contribuyen a este fenómeno son la deforestación y quema de pastizales destinados a extender la actividad pecuaria lo que provoca la pérdida de gran parte de la cobertura vegetal, de manera que durante las precipitaciones se arrastran nutrientes y agroquímicos al embalse (Bazán *et al.*, 2004).

2.3 Suelo

Los suelos de la zona son principalmente calcáreos. El mapa de Suelo de la Agencia Córdoba Ambiente (D. A. C. y T. S. E. M., 2003), clasifica a los suelos de la cuenca del embalse Los Molinos con aptitud de uso Clase III. Los suelos de esta clase, presentan limitaciones para su uso, por lo cual se requiere de cuidadosas prácticas de manejo y conservación para que no pierdan la escasa cobertura fértil. Uno de los usos más frecuentes para este tipo de suelo es el agropecuario.

Estos suelos se caracterizan por ser en un 70% planos bien drenados, franco en superficie, franco arcilloso limoso en el subsuelo; con moderada materia orgánica, alta capacidad de intercambio, sin sales ni sodio en cantidades significativas, ligeramente inclinado (1-0,5%), ligera erosión hídrica y ligera susceptibilidad a la erosión hídrica. La capacidad de uso de este suelo se encuentra limitada por la presencia de horizontes muy arcillosos en el subsuelo y alta susceptibilidad a la erosión hídrica por lluvias (Agencia Córdoba Ambiente, 2003). El 30% restante corresponde a suelos con pendientes moderadas, algo drenado, franco limoso en superficie, franco limoso en el subsuelo, moderadamente bien provisto de materia orgánica, moderada capacidad de intercambio, débilmente ácido, moderadamente inclinado (3,5-1,1%), moderada erosión hídrica ya que

las condiciones climáticas no favorecen su lavado profundo (Agencia Córdoba Ambiente, 2003).

El factor limitante más importante para la productividad del suelo es la falta de humedad (Degioanni *et al.*, 2001; Alessandria *et al.*, 2006).

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Monitoreo del embalse Los Molinos

Los monitoreos en el embalse Los Molinos se vienen realizando en forma conjunta desde el año 2002 por el personal del Laboratorio de Hidráulica de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad de Córdoba y de Aguas Cordobesas S.A. a partir de un proyecto de evaluación de la calidad del agua del embalse establecido entre las partes. Es a mediados del 2008 que me incorporo a las actividades del monitoreo con el fin de extraer muestras para tanto para el análisis de parámetros bacteriológicos como para la evaluación de las comunidades bacterianas.

El diseño del monitoreo fue previamente establecido de acuerdo a las normas IRAM 29012-2 y 29012-3. Se fijaron 5 estaciones de monitoreo: tres de ellas fueron ubicadas en las desembocaduras de los ríos Los Reartes (DLR), San Pedro (DSP) y en la zona de confluencia de los ríos del Medio y Los Espinillos (DEL); además se tomaron muestras en el Centro (CE) y en la Pared del Dique del embalse (PD) (Figura 3-1). En todos los puntos de monitoreo se tomaron muestras de agua superficial (0,5 m de profundidad).

En relación con la búsqueda de la presencia de los herbicidas se consideró oportuna la toma de muestras adicionales en el curso del río Los Reartes debido a que en esta subcuenca es donde se desarrolla la mayor actividad agrícola.

Las muestras fueron tomadas en frascos estériles de 500 mL y conservadas a 4 °C hasta su posterior análisis en laboratorio.

Los lineamientos para la metodología de toma de muestra, almacenamiento, conservación y técnicas analíticas se tomaron del *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005). En el ANEXO II se presenta los resultados del análisis de calidad de las aguas.

La determinación de atrazina se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector UV a 220 nm tal como se presenta más adelante en el apartado de calibración a partir de la puesta a punto de la técnica analítica en laboratorio LETS-INA. Sólo algunas muestras fueron remitidas a un laboratorio privado (Laboratorio de Análisis Cromatográfico-CIC; protocolo M 349) para determinar la concentración de 2,4-D por métodos cromatográficos.

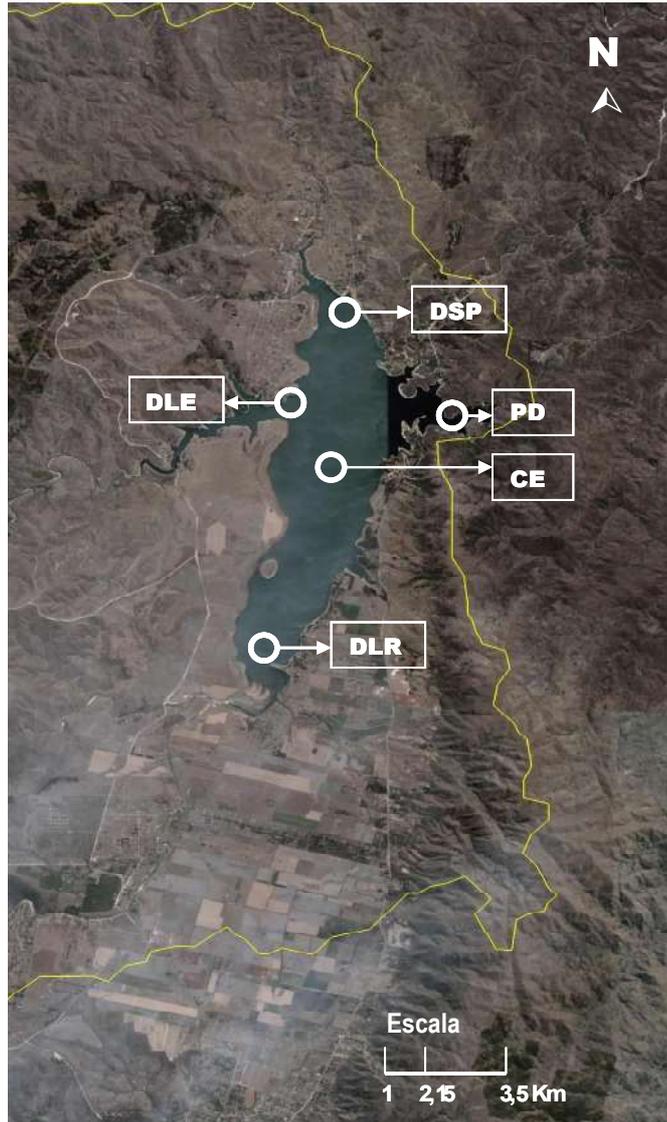


Figura 3-1. Localización de los sitios de monitoreo en el embalse Los Molinos: desembocadura del río Los Reartes (DLR), desembocadura del río Los Espinillos (DLE), desembocadura del río San Pedro (DSP), Centro (CE) y Presa del Dique (PD).

3.2 Evaluación de la exposición a atrazina y a 2,4-D de las comunidades bacterianas del embalse Los Molinos.

Considerando que en la subcuenca del río Los Reartes se desarrolla la mayor actividad agrícola de la zona, se eligió utilizar las muestras de agua extraídas en el sitio de monitoreo de la desembocadura de Los Reartes (DLR) para evaluar la tolerancia como respuesta de la comunidad bacteriana frente a la exposición a atrazina y a 2,4-D, así como evaluar si existe capacidad potencial de degradar los compuestos en estudio. Para ello se emplearon distintas metodologías para evaluar los cambios ocurridos en las comunidades

bacterianas en cuanto (I) biomasa y viabilidad bacteriana, (II) composición genética y (III) función metabólica. Así como también determinar la capacidad de las bacterias de utilizar la atrazina y el 2,4-D como fuentes de carbono y/o nitrógeno. En la Figura 3-2 se presenta un esquema de las técnicas empleadas.

Para los ensayos de tolerancia y de biodegradación se utilizaron las muestras estacionales correspondientes al período Febrero-Diciembre 2011. Las mismas fueron filtradas a través de membranas de 0,8 μm de tamaño de poro y 45 mm de diámetro (Nucleopore-Whatman), con el fin de eliminar el material particulado y los protozoos que pudieran estar presentes, de acuerdo a lo sugerido por Nishimura y col. (2005).

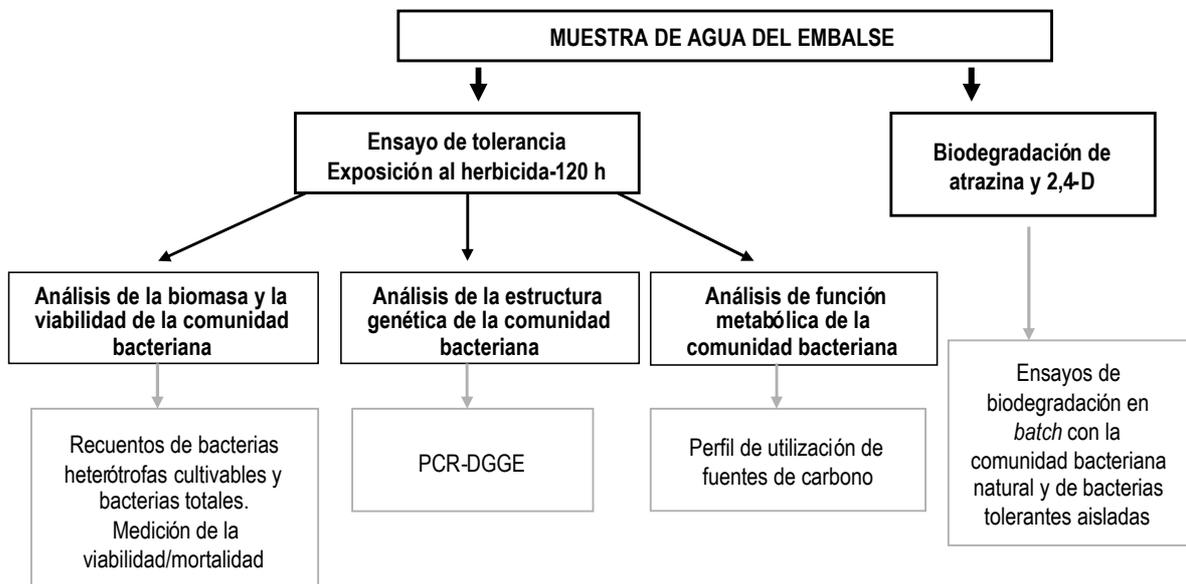


Figura 3-2. Esquema de las técnicas empleadas para determinar el efecto de la atrazina y del 2,4-D sobre las comunidades bacterianas.

3.2.1 Ensayo de tolerancia a atrazina y 2,4-D de la comunidad bacteriana

Para evaluar la tolerancia de la comunidad bacteriana a atrazina y a 2,4-D, se realizaron ensayos en frascos Erlenmeyers conteniendo 150 mL de muestra de agua del embalse Los Molinos. Se realizaron tres tratamientos por compuesto. Para ello se adicionaron alícuotas de las soluciones madre de cada uno de los herbicidas de manera de obtener concentraciones finales de 0,02 (A1); 0,2 (A2) y 2 mg/L (A3) de atrazina, y 2 (D1); 20 (D2) y 200 (D3) mg/L de 2,4-D.

La concentración más baja de atrazina fue seleccionada tomando como referencia las dosis aplicadas en el área de estudio, mientras que la selección de la concentración intermedia se basó en los niveles máximos permitidos para protección de la vida acuática según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, 2005).

En el caso del 2,4-D se seleccionó un rango de concentraciones más elevadas que aquellas correspondientes a las dosis de aplicación en campo. Esto se basó, por un lado en el alto límite de detección de las técnicas espectrofotométricas empleadas, y por el otro a que este compuesto presenta una moderada toxicidad en organismos acuáticos. Los valores de referencia utilizados se basaron en diferentes bioensayos estandarizados como plantas vasculares (EC_{50} 0,29 a 1,28 mg/L), plantas no vasculares (EC_{50} 3,88 a 156,5 mg/L) e invertebrados (LC_{50} 25 a 643 mg/L). Estos organismos a su vez han sido empleados para la evaluación de criterios de mitigación de riesgo ambiental del 2,4-D según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, 2005). Por otra parte se consideró adecuado realizar un estudio prospectivo en escenarios de mayor impacto, en virtud de su frecuente uso y de la tendencia a un progresivo incremento de la actividad agrícola en la zona.

La elección de las concentraciones más altas de ambos herbicidas permite además simular posibles escenarios de riesgo debidos a derrames accidentales, vertidos e incluso por lavado clandestino de tanques de fumigación en el embalse.

3.2.1.1 Determinación de la biomasa y la viabilidad bacteriana

• Recuentos de bacterias heterótrofas cultivables

Se realizaron recuentos de bacterias heterótrofas cultivables (BHC) en muestras tomadas al inicio (T_0), a una hora (T_1), 24 (T_{24}) y 120 horas (T_{120}) del ensayo de tolerancia. Para ello, en placas de Petri conteniendo agar R2A, se sembraron en superficie 0,1 mL de cada muestra. Cabe señalar que se empleó agar R2A por ser un medio de cultivo con bajo requerimiento de nutrientes especialmente diseñado para la recuperación de bacterias estresadas e injuriadas (Reasoner y Geldreich, 1985).

Con el fin de determinar cuales son bacterias tolerantes (BHtol) respecto de las bacterias heterótrofas cultivables, se realizaron recuentos adicionales de bacterias en medio de cultivo conteniendo los compuestos en estudio. Para ello, se sembraron muestras extraídas a T_{120} en placas de Petri conteniendo agar R2A con el agregado de atrazina o 2,4-D. Las concentraciones finales en las placas fueron de 0,02, 0,2 o 2 mg/L

para atrazina, y 2, 20 o 200 mg/L para el 2,4-D dependiendo del ensayo de exposición realizado previamente en frascos Erlenmeyers.

Se realizó un *ensayo control de consumo de materia orgánica* con el objetivo de comprobar que la materia orgánica naturalmente presente en las muestras de agua del embalse Los Molinos puede sustentar el crecimiento bacteriano. Para ello se utilizaron muestras de agua del embalse que fueron filtradas por membrana de 0,8 de tamaño de poro, y autoclavadas a 121 °C durante 15 min con el fin de eliminar las bacterias presentes. Se utilizó una cepa autóctona aislada previamente del embalse Los Molinos la cual fue identificada por métodos moleculares como *Pseudomonas putida* (Ver sección de secuenciación e identificación de bacterias aisladas). A partir de un cultivo puro de esta cepa se preparó una suspensión en solución fisiológica de manera de obtener una concentración inicial de $1,0 \times 10^3$ UFC/mL. Estos ensayos se realizaron en frascos Erlenmeyer con 100 mL de volumen efectivo. Se utilizó como control negativo una muestra de agua sin agregado de inóculo. Este ensayo permitió comprobar que en las muestras con agua del embalse se incrementó la biomasa bacteriana en alrededor de dos ordenes de magnitud alcanzando un recuento de $2,4 \times 10^5$ UFC/mL, mientras que las cepas que fueron inoculadas en solución fisiológica no presentaron crecimiento, incluso disminuyó ($3,7 \times 10^2$ UFC/mL al finalizar el ensayo).

Tanto los *ensayos de tolerancia* como el *ensayo control de consumo de materia orgánica* se realizaron por triplicado. La incubación de los frascos Erlenmeyers se realizó a 20 °C con agitación (140 rpm) durante 5 días. Las placas de Petri con agar R2A fueron incubadas a 20 °C durante 7 días. El número de bacterias heterótrofas cultivables (BHC) y heterótrofas cultivables tolerantes (BHtol) se expresó como unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL). Todos los recuentos se realizaron de acuerdo a lo establecido por el *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005).

- ***Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias viables tolerantes***

Las colonias bacterianas que desarrollaron en las placas de Petri conteniendo agar R2A en presencia de cada uno de los herbicidas, fueron aisladas, caracterizadas e identificadas mediante pruebas bioquímicas y métodos moleculares.

Todas las bacterias seleccionadas fueron conservadas -20 °C en viales conteniendo caldo Tripteína Soja (TSB) y glicerol al 10%.

La caracterización de las bacterias heterótrofas tolerantes (BHtol) aisladas se realizó mediante análisis morfológico y tintorial empleando la coloración de Gram. Para

ello se utilizó un microscopio de epifluorescencia Olympus modelo BX51 (Nueva York, Estados Unidos).

La identificación de las bacterias se confirmó mediante la técnica de secuenciación del gen de la subunidad 16S del ribosoma bacteriano (16S rADN). Se amplificó por PCR el gen de interés empleando los primers F27 y R1492 específicos para el dominio Bacteria. Los productos amplificados se enviaron a la firma Macrogen Inc. (Seul, Korea) para su secuenciación. Se determinaron las secuencias de mayor similitud en la base de datos del GenBank (*Nucleotide Collection*) utilizando la función BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) en el sitio del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). La asignación taxonómica de las bacterias se realizó por medio del programa de clasificación filogenética en el sitio *Ribosomal Database Project II* (RDP Classifier; <http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) utilizando un nivel de confianza de al menos 80%.

- **Recuentos de bacterias totales**

Se determinó el número de bacterias totales (BT) por microscopia de epifluorescencia empleando el colorante 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Se utilizó un microscopio de epifluorescencia Olympus BX51 con objetivo de inmersión, aumento de 100x y filtros de emisión fluorescente para DAPI. Se tomaron 100 mL de muestra al inicio (T_0) y 50 mL al final, luego de 120 horas (T_{120}) del ensayo de tolerancia. Las muestras fueron filtradas a través de membranas de policarbonato estériles de 0,22 μm de tamaño de poro y de 25 mm de diámetro utilizando jeringas de vidrio de 25 ml. Las membranas fueron removidas de los portafiltros y se dejaron secar a temperatura ambiente en placas de Petri. Para la tinción con DAPI se dispusieron las membranas en placas de Petri y se les adicionó 20 μL de agua destilada con el fin de humedecerlas y así facilitar la dispersión del colorante. Se tomaron 20 μL de la solución de DAPI (Solución II) y se dispensó en 4 aplicaciones de 5 μL en la membrana filtrante para cubrirlas homogéneamente. Con el fin de retirar el colorante que no se fijó a las células, se lavaron las membranas filtrantes dos veces con etanol 80% v/v, y una vez con agua destilada. Finalmente, se dejaron secar a temperatura ambiente.

Las membranas fueron montadas en portaobjetos y fijadas con 5 μL de Mowiol 4-88 antifade (Hoechst, Frankfurt, Alemania). Posteriormente se agregaron otros 5 μL de Mowiol sobre la superficie de la membrana y finalmente se las cubrió con cubreobjetos y se empleó aceite de inmersión (Olympus) para su observación al microscopio. Se

analizaron entre 20 y 30 campos ópticos con el fin de determinar el número de bacterias. Para ello se utilizó la siguiente ecuación (Kepner y Pratt, 1994):

$$\text{Células/mL} = (\text{N} \times \text{At}) / (\text{d} \times \text{Vf} \times \text{G} \times \text{Ag})$$

Donde:

N: número de células contadas en "G" campos

At: área efectiva del filtro (mm²) [(diámetro 12,2 mm; Área efectiva 116,94 mm²)]

d: factor de dilución ($V_{\text{final}} / V_{\text{muestra}}$)

Vf: volumen de muestra filtrada (mL) (5-10 mL)

G: número de campos contados (20-30)

Ag: área del campo contado (mm²) [(diámetro 5,1 mm; Área del campo 8,01 mm²)]

- **Determinación de la viabilidad mediante Citometría de Flujo**

Mediante el análisis por citometría de flujo se evaluaron los cambios en la viabilidad/mortalidad de las comunidades bacterianas presentes en las muestras tomadas a tiempo inicial (T₀) y final (T₁₂₀) de cada ensayo de tolerancia a atrazina y 2,4-D. Los diferentes estados de viabilidad de las bacterias (viables, injuriadas y/o muertas) se evaluaron mediante el empleo del kit comercial de viabilidad celular (BD *Cell Viability Kit* - Becton Dickinson Biosciences, California, Estados Unidos), que posee dos marcadores fluorescentes que permiten la tinción diferencial del ADN: yoduro de propidio (PI) que emite fluorescencia roja y naranja de tiazol (TO) que emite fluorescencia verde. Por un lado el TO puede atravesar todas las membranas celulares, mientras que PI sólo puede ingresar si las membranas celulares están dañadas. De esta manera, TO tiñe todo tipo de células mientras que PI sólo tiñe células muertas. Además este kit de viabilidad cuenta con una concentración conocida de *beads* fluorescentes (1 µm de diámetro) que posibilita la cuantificación de las células.

Se utilizó el Citómetro de Flujo BD FACS Aria II (Becton Dickinson-BD Biosciences, California, Estados Unidos) equipado con un láser Blue Diode de 488 nm de longitud de onda y un láser HeNe (gas Helio-Neón) de 633 nm de longitud de onda. Este equipo cuenta con los siguientes filtros: 530/30 (FitC-FL1), 585/42 (PE-FL2), 616/23 (PE-Pex Red), 660/20 (APC-FL4), 695/40 (Per CP-FL3), 780/60 (APC-Cy7).

Se utilizó una cepa de *Pseudomonas putida* previamente aislada del embalse Los Molinos, para determinar la posición en el citograma de bacterias vivas, injuriadas y/o muertas, con el fin de ajustar el programa de adquisición de datos. Para ello, de una anzada de una colonia crecida en placa de Petri con agar TSA de 18 horas, se realizó una suspensión en solución fisiológica a partir de la cual se realizaron diluciones sucesivas (1:10) en medio mínimo mineral hasta obtener un número inicial de $1,0 \times 10^4$ UFC/mL. Una alícuota de esta suspensión fue sometida a 80 °C durante 5 min, siguiendo el procedimiento de Berney y col. (2007) quienes utilizaron calor como agente estresor con el fin de identificar la posición de las bacterias muertas en los citogramas. Otra alícuota fue utilizada como control de crecimiento con bacterias vivas, con el fin de identificar su posición en el citograma. Los resultados del ensayo de calibración del método citométrico en combinación con el kit de viabilidad se presenta a continuación dentro de esta sección.

Tanto las suspensiones del cultivo puro de *Pseudomonas putida* como las muestras de agua proveniente de los ensayos de tolerancia a los herbicidas fueron fijadas con una solución buffer de tinción y luego incubadas con los fluorocromos y las *beads* del kit de viabilidad. Para ello, 300 µL de muestra fueron diluidos 1:1 (v/v) con la solución buffer de tinción y luego adicionados con 3 µL de TO y 3 µL de PI. Luego de una suave agitación, se agregaron 50 µL de las *beads*. La reacción se realizó en tubos de Falcon para citometría de 7 mL de capacidad. Luego de 5 min de incubación a temperatura ambiente se procedió a la medición por citometría. La lectura se realizó dentro del lapso de estabilidad de la fluorescencia (máximo tres horas).

La calibración y puesta a punto del método fue realizada por personal técnico del Servicio de Citometría de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – UBA. Para la adquisición de datos el equipo fue programado de la siguiente manera: Velocidad de toma de datos (*threshold rate*) a 250 eventos/seg, los voltajes de FSC-H (*Forward scatter*) a 180, SSC-H (*side scatter*) a 240, FitC-H a 440, PE-H a 480 y PercP-H a 480. La duración de la adquisición de datos no superó 1,1 minutos. El valor máximo para la adquisición de eventos totales se estableció en 50.000 eventos con un umbral mínimo de 5.000. El registro de eventos se realizó bajo una escala logarítmica.

Al representar en dos dimensiones los parámetros citométricos se puede obtener información acerca de las propiedades celulares. Es así que en este trabajo se utilizaron los siguientes parámetros: (A) FitC-H vs. SSC-H, discrimina por viabilidad bacteriana y el biovolumen. Cuanto mayor es el valor en el eje de FitC-H (TO-fluorescencia verde) mayor

es la incorporación del marcador TO, que indica que las bacterias se encuentran viables y activas. En el eje de SSC-H, se discrimina por biovolumen, con lo cual la combinación de ambos permite estimar como varían en tamaño aquellas bacterias vivas y activas; y (C) PercP-H (PI-fluorescencia roja) vs. FitC-H (TO-fluorescencia verde). Nuevamente, el aumento en el eje de FitC-H representa a las células vivas y activas, mientras que el aumento en el eje de PercP-H representa a las células que incorporaron el marcador PI, o sea aquellas que están muertas. En el caso de observar eventos con marcación positiva tanto de PercP-H como de FitC-H podría tratarse de células injuriadas o metabólicamente comprometidas (Davey y Kell, 1996; Gasol, 1999; Gasol y del Giorgi, 2000; Casamayor *et al.*, 2007; Hoffman, 2008).

Para el cálculo de bacterias se utilizó la siguiente ecuación basado en las especificaciones del Kit de viabilidad de BD:

$$CB = (NE/Nb) \times [(Bst \times Vb)/VM]$$

Donde:

CB= Concentración de bacterias (bacterias/ μ L)

NE = Número de eventos totales

Nb= Número de eventos de las beads

Bst= Beads standard: Concentración de beads en el Kit (1007/ μ L)

Vb= Volumen de Beads (50 μ L)

VM= Volumen de muestra (300 μ L)

• **Ensayo de calibración de la tinción de viabilidad/mortalidad empleando el kit comercial BD**

De las dos alícuotas tomadas de una suspensión pura de *Pseudomonas putida* que fueron utilizadas por un lado como control de bacterias en estado de crecimiento, y por el otro como control de bacterias muertas y/o injuriadas que fueron sometidas a calor (80 °C durante 5 min).

Se presentan en la Figura 3-3 las bacterias metabólicamente activas y en la Figura 3-4 las bacterias sometidas a calor. En ambas Figuras se representan en gráficos bi-dimensionales las variables citométricas: PercP-H vs. FitC-H (Figura 3-3.A) y FitC-H vs. SSC-H (Figura 3-4.B).

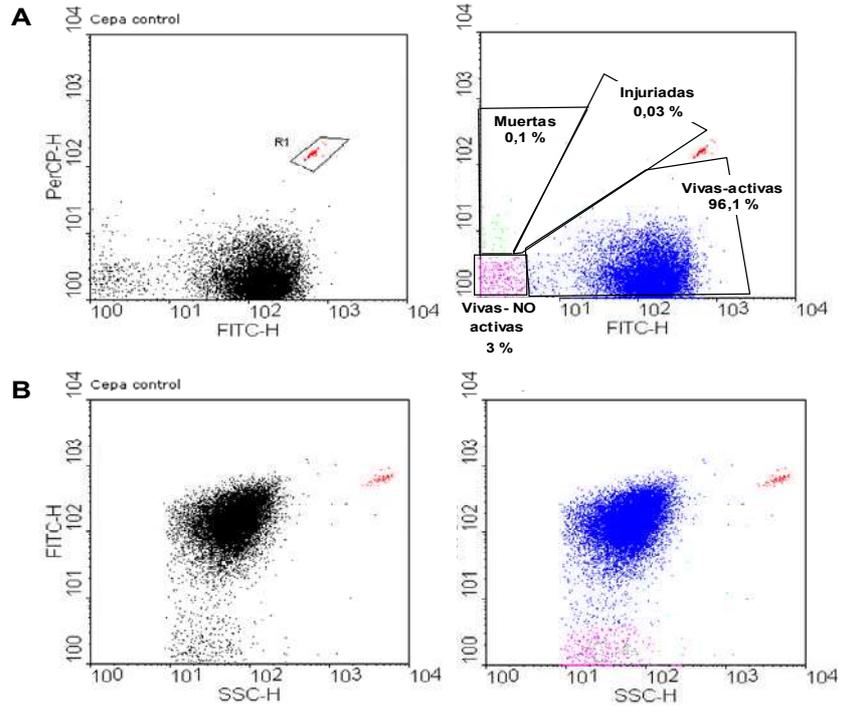


Figura 3-3. Citometría de flujo de un cultivo de *P. putida* en etapa de crecimiento. Se grafica (A) PercP-H vs. FitC-H y (B) FitC-H vs. SSC-H. Se representan en las ventanas con color los porcentajes de los agrupamientos de las distintas categorías: Vivas-Activas (azul), Vivas-No activas (rosa), Injuriadas (celeste) y Muertas (verde). En rojo se localizan las *Beads*.

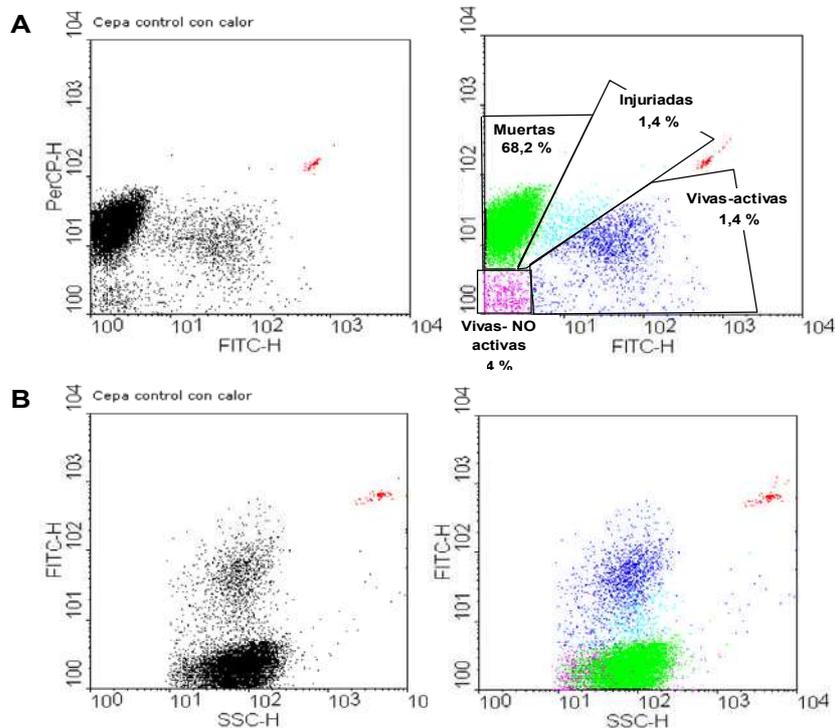


Figura 3-4. Citometría de flujo de un cultivo de *P. putida* sometida a calor. Se grafica (A) PercP-H vs. FitC-H y (B) FitC-H vs. SSC-H. Se representan en las ventanas con color los porcentajes de los agrupamientos de las distintas categorías: Vivas-Activas (azul), Vivas-No activas (rosa), Injuriadas (celeste) y Muertas (verde). En rojo se localizan las *Beads*.

A partir de la distribución de los eventos registrados en los citogramas se pudieron identificar cuatro regiones correspondientes a diferentes estados metabólicos de las bacterias. De esta manera, las células que presentaron altos valores en el eje de FitC-H y bajos valores en el eje de PercP-H (ventana color azul) correspondieron a las bacterias “Vivas y activas” (Figura 3-3.A). Las células “Muertas” se identificaron por presentar valores altos en el eje de PercP-H y valores bajos en el eje FitC-H, y se localizaron dentro de la ventana de color verde. Un tercer grupo correspondiente a las células “Injuriadas” o metabólicamente comprometidas fue localizado en el citograma en la región donde las células presentaron marcación positiva tanto de PercP-H como de FitC-H (ventana color celeste). Un cuarto grupo con una baja marcación de ambos fluorocromos fue identificado como bacterias vivas con una baja o nula actividad y se denominó al agrupamiento como bacterias “Vivas-no activas” que se presentan en la ventana color rosa. Para la cuantificación de los agrupamientos se utilizaron las *beads* que se identifican en los citogramas con el color rojo.

Del análisis del cultivo de *P. putida* en estado de crecimiento exponencial se pudo comprobar que el 96,1% de células se hallan en la categoría “Vivas-Activas”, mientras que el 0,1% correspondió a la categoría de células “Muertas” y el 0,03% al de células “Injuriadas” (Figura 3-3).

Por otro lado, del cultivo de *P. putida* sometido a estrés térmico (Figura 3-4), se halló que el porcentaje de la categoría “Vivas-Activas” decreció a 1,4%, mientras que la categoría bacterias “Muertas” ascendió a 68,2%, incluso las bacterias “Injuriadas” aumentaron a 1,4%. Respecto al agrupamiento identificado como bacterias “Vivas-No activas”, en ambos casos presentó porcentajes similares de 3 y 4,1% para el cultivo en estado de crecimiento y sometido a calor, respectivamente.

Una vez delimitadas las ventanas que identificaron las categorías de cada estado metabólico, se graficó FitC-H vs. SSC-H (Figuras 3-3.B y 3-4.B). En las muestras de los cultivos de *P. putida* se corroboró que las bacterias agrupadas en la categoría “Vivas-activas”, presentaron un *cluster* agrupado con una pequeña tendencia a incrementar en el eje SSC-H, parámetro asociado al tamaño celular. Por lo tanto estos datos reflejarían que cuando hay mayor actividad en las bacterias se incrementa levemente el tamaño celular relacionado tal vez con la división celular. Mientras que el agrupamiento identificado como “Muertas” presentaron una distribución del biovolumen más

compacta. El agrupamiento de bacterias Vivas-no activas fue hallado hacia valores de SSC-H bajos lo cual estaría asociado a tamaños de bacterias pequeñas.

A partir del ensayo de calibración en este trabajo las comunidades bacterianas provenientes de los ensayos de tolerancia se analizaron en base a los agrupamientos de las siguientes categorías de estados metabólicos: Bacterias Vivas-Activas, Vivas-no activas, Injuriadas y Muertas. Una vez identificados estos grupos de bacterias se calculó la proporción de cada uno de ellos respecto al total de eventos registrados.

Para el análisis de los citogramas se empleó el programa WinMDI 2.9 (<http://facs.scripps.edu/software.html>).

- **Análisis estadístico**

Los valores de los recuentos de las bacterias heterótrofas cultivables (BHC) y de las bacterias totales (BT) en cada ensayo de tolerancia fueron evaluados estadísticamente mediante análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test *a posteriori* de comparaciones múltiples de Tukey con un nivel de significación de 0,05. Para ello se utilizó el software estadístico GraphPad (San Diego, CA. Estados Unidos).

3.2.1.2 Evaluación de la estructura genética de las comunidades bacterianas

Las técnicas moleculares que se describen a continuación fueron llevadas a cabo en el Laboratorio de Ecología Microbiana del INGEBI – CONICET, bajo la dirección y en colaboración con el grupo de Dr. Leonardo Erijman y la Dra. Eva Figuerola.

- **Extracción y purificación de ADN genómico**

Se realizó la extracción del ADN genómico de las muestras tomadas a T_0 y T_{120} de los ensayos de tolerancia a los herbicidas con el fin de determinar cambios en la estructura de las comunidades bacterianas. Para ello se utilizó el método TSAI y OLSON propuesto por Araya (2003) modificado. Se tomaron alícuotas de 100 mL y 50 mL al inicio (T_0) y al final (T_{120}) respectivamente, de cada uno de los ensayos de tolerancia. Las muestras fueron filtradas a través de membranas de acetato de celulosa de 0,22 μm de tamaño de poro. Posteriormente cada membrana fue colocada en un tubo Falcon de 15 mL conteniendo 2 mL de solución de lisis. Los tubos fueron incubados a 37 °C durante 2 horas con agitación. Luego se adicionó 2 mL de solución buffer Tris-HCl (pH 8.0) a cada tubo y fueron sometidos a tres ciclos consecutivos de congelamiento/descongelamiento con nitrógeno líquido/calor a 65 °C. Una vez finalizado este paso se les agregó 40 μL de

Rnasa A (20 mg/mL) y se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Posteriormente se realizaron tres extracciones sucesivas. Para la primera extracción se agregaron 2 mL de la solución CIAA a cada tubo, se mezclaron por inversión y luego se centrifugaron durante 15 min a 3500 G. Para la segunda extracción se tomaron 3 mL de la capa acuosa y se mezclaron con 1,5 mL de fenol:CIAA y 1,5 mL de CIAA, se centrifugaron 15 min a 3500 G. Para la tercera extracción se tomaron 2,5 mL del sobrenadante y se diluyó con un volumen 1:1 (v/v) de CIAA. Finalmente, se tomaron dos fracciones de 1 mL del sobrenadante y se colocaron en dos tubos Eppendorf de 2 mL. A cada tubo se les adicionó 1 mL de etanol 100% y se los dejó *overnight* para favorecer la precipitación del DNA. Posteriormente los tubos Eppendorf se centrifugaron a 4 °C durante 40 min a 16.000 G, luego se lavaron los precipitados con 300 µL de etanol 70% y se resuspendieron con 50 µL de agua PCR (apirrogénica). Este procedimiento se repitió 2 veces para asegurar el lavado y ausencia de sales que pudieran interferir con las reacciones de amplificación subsiguientes de los precipitados (*pellets*). Una vez resuspendidos los *pellets*, se determinó la concentración de ADN de cada muestra mediante el equipo DNA NanoDrop utilizando 2 µL de la muestra. Se cuantificó el ADN en ng/µL. Se utilizó como criterio para aceptar una concentración de ADN adecuada para ser amplificada por PCR que sea mayor a 5 ng/µL.

• **Amplificación por PCR**

Para la amplificación del fragmento de 200 pb de largo del dominio V3 de la secuencia del ADN ribosomal de la subunidad 16S (ADNr 16S) se utilizaron los *primers* comerciales específicos para Bacteria F341-GC y R534 (Muyzer *et al.*, 1993). El *primer* F341-GC presenta una secuencia adicional con un mayor número de pares de base GC en posición 5' utilizada para evitar su desnaturalización durante la electroforesis en gel (Tabla 3-1).

Tabla 3-1. Características de los *Primers* F341-GC y R534

PRIMERS	SECUENCIA GENICA (5'-3')	ESPECIFICIDAD
F341-GC	CGCCCGCCGCGCGGCGGGCGGGGCGG GGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG	Bacteria (16S)
R534	ATTACCGCGGCTGCTGG	Universal (16S)

En la Tabla 3-2 se presenta la composición de la solución empleada para la reacción de amplificación por PCR de la secuencia del ADN ribosomal 16S. Se utilizaron 2 μL de cada muestra de interés para el proceso de amplificación por PCR. Se realizó un control de reacción de amplificación sin el agregado de ADN.

Tabla 3-2. Reactivos utilizados para la solución de amplificación de la secuencia del ADNr 16S

REACTIVOS	SOLUCION STOCK	VOLUMEN x MUESTRA (μL)
Buffer Taq	10 x	5,0
MgCl ₂	50 mM	3,0
Dimetilsulfoxido (DMSO)	5%	2,5
BSA	10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0,5
dNTP	2 mM (50 μM c/u)	5,0
Primer R (R534)	10 μM	0,5
Primer F (F341-GC)	10 μM	0,5
Tag polimerasa (Invitrogen)	0,03 U/ μl	0,2
DNA muestra	2-5 ng/ μl	2,0
H ₂ O apirogenica		30,8

La amplificación por PCR se realizó en un equipo BIOMETRA Professional thermocycler (Goettingen, Alemania). El programa utilizado se presenta a continuación en la Tabla 3-3.

Tabla 3-3. Programa utilizado para la amplificación por PCR

Tamaño esperado de la amplificación	200 pb
Desnaturalizaciónn inicial	94 °C 5 min
Tiempo de desnaturalización	94 °C 45 seg
Temperatura de annealing (°C)	55 °C
Tiempo de annealing	1 min
Tiempo de extensión	72 °C 1 min
CICLOS	30
Extensión final	72 °C 10 min

Una vez finalizada la amplificación, se tomó una muestra de los productos de PCR y se corrieron en gel de agarosa al 2% con 35 mL de buffer TAE 1x conteniendo 35 µL de bromuro de etidio (1000X). Una vez solidificado el gel se sembraron 5 µL de los productos de PCR teñidos previamente con 2 µL del *loading*. La corrida electroforética se realizó a 70 V durante 30 min (BioRad Power Pac 300, Bio-Rad Laboratories, California, Estados Unidos). Los geles fueron revelados con un transiluminador.

- ***Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE)***

La técnica de DGGE es un método electroforético de separación basado en las diferencias en la migración de diferentes fragmentos de doble cadena de ADN realizadas en gel conteniendo concentraciones crecientes de compuestos desnaturizantes. Cuando se someten los fragmentos de ADN, parcialmente disociados por acción del desnaturizante en un campo electroforético, estos migrarán con diferentes velocidades relativas dependiendo del tamaño de los fragmentos y su composición nucleotídica. De esta manera se obtiene un perfil de bandas que representa la variabilidad genética que se encuentra en una muestra.

- ~ ***Preparación del gel y corrida electroforética***

Mediante el uso de un armador de gradiente (Hoefer Scientific Instruments, Massachusetts, Estados Unidos), se prepararon geles de poliacrilamida al 8% con un gradiente lineal de 40 a 70% del desnaturizante. Siendo la composición del desnaturizante: urea 7 M y formamida 40% v/v. Los productos de amplificación de la secuencias del gen 16S rADN (200 pb) fueron concentrados empleando una centrifuga *speed vacuum* (FTS Systems, SP Scientific, Filadelfia, Estados Unidos) hasta 10 µl para ser sembrados en el gel. Las condiciones de electroforesis fueron: 65 V durante 16 horas a 60 °C en buffer TAE 1X. Los geles fueron teñidos con el marcador de ADN **Sybr Gold** (*Molecular Probes*) 1X en TAE 1X durante 30 min, posteriormente lavados en TAE 1X durante 10 min y finalmente visualizados en transiluminador.

- ~ ***Análisis de los patrones de bandas de DGGE***

Para identificar cambios en la estructura de las comunidades bacterianas, se compararon los perfiles obtenidos en los geles de DGGE. Para ello se analizaron las bandas de acuerdo a su posición y a su intensidad de marcación. Con esta información se construyeron matrices de similitud y se realizó un posterior análisis de agrupamiento

(*Cluster Analysis*) de los perfiles de bandas. Los resultados del agrupamiento se representaron en forma de dendrograma. Este análisis de agrupamiento se basa en una técnica de clasificación donde las muestras son agrupadas en función de sus características utilizando para ello el algoritmo de UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic media*) (Sneath y Sokal, 1973).

Las matrices de similitud se construyeron empleando el coeficiente de Dice-Sørensen. Este índice que se utilizó para el análisis de fuentes de carbono, aquí se aplica para comparar el número de bandas que comparten dos muestras y las divide por el número de bandas de cada muestra respectivamente. El valor del coeficiente oscila entre 0, para el cual no hay coincidencia de ninguna banda, y 1, para el cual el patrón de bandas de dos muestras es idéntico (LaPara *et al.*, 2002).

La posición de cada banda en el gel de DGGE representa una OTU (Unidad Taxonómica Operacional) o filotipo particular. El número de bandas identificadas de cada perfil revela la riqueza genética de la muestra, así como el cálculo del índice de Shannon-Weaver (H') se emplea para obtener un valor de diversidad genética.

Se utilizó el programa Gene Tools (SynGene) para el análisis de los patrones de bandas del DGGE. Todos los análisis fueron realizados con el programa PAST.

3.2.1.3 Evaluación de la función metabólica de la comunidad bacteriana

Se tomaron muestras al inicio (T_0) y al final (T_{120}) de los ensayos de tolerancia a atrazina y 2,4-D con el fin de estudiar los cambios en la función metabólica. Para ello se implantó el análisis de utilización de fuentes de carbono, respecto a un control sin exposición a los pesticidas, conocido como perfil funcional de la comunidad bacteriana. Los ensayos se efectuaron en microplacas estériles de 96 pocillos (Greiner Bio-One- GBO, Alemania) basado en el sistema comercial Biolog EcoPlates™ (Biolog Inc., Hayward, CA, Estados Unidos). Se utilizaron treinta (30) fuentes de carbono clasificadas en a) aminoácidos (L-arginina, L-cisteína, L-glutámico, L-lisina, L-ornitina, L-triptofano); b) carbohidratos (arabinosa, celulosa, dextrina, glucosa, lactosa, maltosa, manitol, ramnosa, sacarosa, sucrosa, xilosa); c) ácidos orgánicos (ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido acético, ácido maleico); d) polímeros y compuestos aromáticos (adenina, almidón, anilina, fenol, glicerina, Tween 80); y e) vitaminas (Inositol, p-amino-benzoico, ácido nicotínico).

Para la siembra se colocaron en cada pocillo de las microplacas 225 μ L de una solución II de fuente de carbono y 25 μ L de las muestras extraídas a T_0 o T_{120} de los ensayos de tolerancia a los herbicidas. De esta manera la concentración final de cada fuente de

carbono en cada pocillo fue de 51 mg/L. Las microplacas se incubaron a 20 °C durante 10 días. El consumo de sustrato se determinó cada 48 h mediante lecturas de la absorbancia a 600 nm en un lector automático de microplacas (Thermo S/N). Estos ensayos se realizaron por triplicado.

La resazurina en condiciones oxidativas presenta una tonalidad violeta oscuro, tomando una coloración rosada a medida se incrementa la condición reductora del medio, debido al aumento de la concentración de CO₂ producto de la respiración celular.

Para el análisis de los perfiles de consumo de fuentes de carbono se utilizaron los siguientes parámetros:

- **Respuesta Metabólica Promedio total - RMP:** La respuesta metabólica promedio se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación (Bertolone, 2009):

$$\text{RMP} = \frac{\sum (\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{p1})}{30}$$

Siendo:

Abs control: valor de la absorbancia de cada pocillo control (sin fuente de carbono)

Abs p₁: valor de la absorbancia de cada pocillo con fuente de carbono.

N: Número de fuentes de carbono (30)

- **Consumo relativo por tipo de sustrato.** Corresponde a la respuesta metabólica por tipo de sustrato (aminoácidos, ácidos orgánicos, carbohidratos, polímeros y compuestos aromáticos, y vitaminas). Empleando la misma ecuación que la **Respuesta Metabólica Promedio total**, excepto que se divide por el número de sustratos de cada grupo.
- **Diversidad Metabólica de la Comunidad-DMC:** Este parámetro representa el número de fuentes de carbono que fueron consumidas y permite estimar la diversidad catabólica de las comunidades bacterianas. Se estableció como umbral para considerar consumo de sustrato un valor de absorbancia superior al 25% respecto al control (Garland, 1991).

Luego de 10 días de incubación de las microplacas se realizó el registro y el análisis de los resultados obtenidos.

• **Cálculo de los Índices de diversidad**

Se emplearon los índices de Shannon-Weaver (H'), de Equitatividad (E'), de Dominancia (D') y de Similitud de DICE-Sørensen (S') para estimar la diversidad funcional, la homogeneidad de consumo, la preferencia y la similitud del perfil de fuentes de carbono en cada grupo respectivamente.

~ **Índice de Diversidad de Shannon-Weaver (H')**

El índice de Diversidad de Shannon-Weaver se empleó para evaluar la diversidad funcional calculándose para ello el consumo proporcional de cada una de las fuentes de carbono utilizadas respecto al total.

$$H' = -\sum p_i \times (\ln p_i)$$

Siendo:

p_i = uso proporcional de cada fuente de carbono

~ **Índice de Equitatividad (E')**

El índice de Equitatividad evalúa la homogeneidad de la intensidad relativa del consumo de cada fuente de carbono. Una homogeneidad alta implica que el consumo de los sustratos utilizados mostró la misma intensidad, es decir que cada fuente de carbono es utilizada en la misma proporción. Mientras que una baja homogeneidad, indica desigualdades en la preferencia de consumo de algunas fuentes de carbono respecto a otras. Los valores se encuentran entre 0 (uso preferencial) a 1 (alta homogeneidad).

$$E' = H' / \log S$$

Siendo:

H' = Índice de diversidad de Shannon-Weaver

S = N° de pocillos positivos

~ **Índice de Dominancia (D')**

Mediante el cálculo del Índice de Dominancia o Índice de Diversidad de Simpson (D'), se puede cuantificar la probabilidad que dos individuos (en este caso fuentes de carbono) seleccionados aleatoriamente en una comunidad infinita, pertenezcan a una misma categoría. Para el cálculo de Simpson se utiliza la siguiente fórmula:

$$D = \sum_{i=1}^s p_i^2$$

Donde:

p_i: es el cociente entre (*ni* / N) Donde *ni* representa la abundancia de un sustrato y
N: el número total de sustratos (en este caso 30).

Del cálculo del índice de diversidad de Simpson (Khan, s.a.; Marrugan, 1988) surge el valor de dominancia que tiene cada individuo dentro de una comunidad. La dominancia, en el contexto de la utilización de fuentes de carbono, permite evaluar en el conjunto de los sustratos consumidos, cuales tienen la misma intensidad de consumo. Es decir, si hay algún sustrato que es consumido con mayor preferencia respecto a los otros.

~ **Índice de Similitud de Dice-Sørensen (S')**

El índice de Similitud de Dice-Sørensen es uno de los más simples para comparar dos muestras. En este trabajo de Tesis se emplea para evaluar la similitud en el consumo de fuentes de carbono entre el control (muestra sin herbicida) y cada una de las muestras expuestas a cada herbicida. Este índice tiene la ventaja de proporcionar más peso a los términos de doble presencia, entendido aquí como aquellos compuestos que son consumidos tanto por el control como por la muestra con herbicida. Los valores se encuentran entre 0 (disimilitud) y 1 (similitud).

$$S' = [(2C)/(2C+A+B)]$$

Siendo:

C= Nº de fuentes de carbono consumidas tanto por el control como por una muestra expuesta a herbicida.

A= Nº de fuentes de carbono que utiliza sólo la comunidad bacteriana del control.

B= Nº de fuentes de carbono que utiliza sólo la comunidad bacteriana de la muestra expuesta a herbicida.

• **Análisis estadístico**

Las diferencias estadísticas halladas entre los valores de Respuesta Metabólica Promedio del control y de cada una de las muestras expuestas a atrazina y a 2,4-D se determinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un factor. Se utilizó el test de comparaciones múltiples de Tukey para un nivel de significación de 0,05. Se empleó el software estadístico GraphPad.

El cálculo de los índices de diversidad de Shannon-Weaver (H'), de Equitatividad (E'), Dominancia (D') y de Similitud de Dice-Sørensen (S') se realizaron empleando el paquete estadístico PAST (*Paleontological Statistics software package*, versión 1.92, <http://folk.uio.no/ohammer/past>).

Además con el fin de evaluar las variaciones entre las muestras tomadas en las distintas estaciones del año (análisis temporal) en relación con el uso de fuentes de carbono se utilizó el Análisis de Componentes Principales (PCA). Para ello se construyeron los vectores de datos multivariados considerando los controles y todas las muestras expuestas a los herbicidas. Se realizó un Análisis de Componentes Principales para cada tipo de sustrato (aminoácidos, ácidos orgánicos, carbohidratos, polímeros y compuestos aromáticos, y vitaminas).

3.2.2 Evaluación de la capacidad de las comunidades bacterianas y de las bacterias tolerantes aisladas de degradar atrazina y 2,4-D

Con el objetivo de determinar si existe capacidad degradativa de atrazina y 2,4-D de las comunidades bacterianas se realizaron ensayos de biodegradación en sistemas *batch*.

Para ello se emplearon las muestras de agua provenientes de los monitoreos estacionales tomadas en la desembocadura del río Los Reartes del embalse Los Molinos procesadas de la misma manera que las empleadas en el ensayo de tolerancia.

Los ensayos se realizaron en frascos Erlenmeyer con un volumen efectivo de 100 mL incubados a una temperatura de 20 °C con agitación (140 rpm). Las muestras de agua del embalse fueron incubados con 0,2 mg/L de atrazina o 20 mg/L de 2,4-D dependiendo del ensayo. Los ensayos de biodegradación se realizaron por triplicado y tuvieron una duración de tres meses.

La remoción de la atrazina y 2,4-D fue evaluada mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrofotometría UV respectivamente.

3.3 Soluciones y medios de cultivo

• *Medios de cultivo*

Agar R2A: Extracto de levadura 0,5 g, Peptona 0,5 g, Aminoácidos 0,5 g, Dextrosa 0,5 g, Almidón soluble 0,5 g, Piruvato de sodio 0,3 g, fosfato dipotásico 0,3 g, Sulfato de magnesio heptahidratado 0,05 g y agar 12 g. Agua destilada csp 1 L.

Agar TSA: Peptona de caseína 15 g, Peptona de soja 5 g, Cloruro de sodio 5 g y agar 15 g. Agua destilada csp 1 L.

Solución de vitaminas: D-pantotenato de calcio 40 mg, Ácido fólico 2 mg, Inositol 200 mg, Ácido nicotínico 40 mg, Ácido p-aminobenzoico 20 mg, Piridoxina 40 mg, Riboflavina 20 mg, Tiamina 40 mg. Agua destilada csp 100 mL. Esterilizar por filtración a través de membrana de 0,22 µm de tamaño de poro

Solución de sales: CaCl₂·2H₂O 1 g, MnSO₄·H₂O 0,3 g, FeSO₄·7H₂O 0,5 g, Sal de sodio dihidratado de etilendiamino tetra acético (EDTA) 0,2 g. Agua destilada csp 1 L. Esterilizar por filtración a través de membrana de 0,22 µm de tamaño de poro.

Medio mínimo mineral: K₂HPO₄ 1,73 g; KH₂PO₄ 0,68 g; (NH₄)₂SO₄ 0,83 g; MgSO₄·7H₂O, 0,1 g. Agua destilada csp 1L. Llevar pH 7,4. Esterilizar a 121 °C durante 15 min.

Solución madre de atrazina: Atrazina 20 mg. Agua destilada csp 1L.

Solución madre de 2,4-D: Ácido 2,4-diclofenoxiacético 10000 mg se disuelven en una solución de NaOH 0,1 N estéril (10 ml). Agua destilada csp 1 L.

Ambas soluciones de herbicidas fueron esterilizadas por filtración a través de membrana de 0,22 µm de tamaño de poro.

• *Tinción de bacterias totales con DAPI*

Solución madre de DAPI (Solución I): DAPI 350 ng en 1 µL de agua apirogénica.

Solución II de DAPI: 1,4 µL de la Solución I. Agua apirogénica csp 1 mL.

• *Citometría de flujo*

Buffer fosfato PBS 1x: Disolver NaCl 8g, KCl 0,2g, Na₂HPO₄ 1,44g, KH₂PO₄ 0,24g en 800 mL. Ajustar pH a 7.4. Agua destilada csp 1L. Esterilizar por autoclave.

Buffer de tinción: buffer fosfato PBS 1X adicionado con Tween 20 (0,01% v/v). Esterilizado por el método de filtración a través membrana de nitrato de celulosa de 0,22 μm de tamaño de poro.

• **Extracción y purificación de ADN**

Solución de Lisis: NaCl 5M 1,5 mL; EDTA 0,5 M (pH 8.0) 10 mL y lisozima 75 mg. Agua destilada csp 50 mL.

Solución Buffer Tris-HCl (pH 8.0): NaCl 5M 1mL; Tris-ClH 1M (pH 8.0) 25 mL y 5 g de SDS. Agua destilada csp 50 mL.

Solución CIAA: fenol (pH 8.0): cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1)

• **Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante**

Solución madre TAE 50x: Tris base 242 g, ácido acético glacial 57,1 mL y EDTA 0,5 M 100 mL. Agua destilada csp 1 L. Llevar a pH 8.0

Solución buffer TAE 1x (Tris-acetato): Diluir con agua destilada la solución madre de TAE 50x hasta obtener la concentración deseada.

• **Consumo de fuentes de carbono**

Solución madre de resazurina: Resazurina (MERCK, Nueva York, Estados Unidos) al 0,1 g en 100 mL de agua destilada

Soluciones madre de las fuentes de carbono (Solución I): 1g de compuesto (L-arginina, L-cisteína, L-glutámico, L-lisina, L-ornitina, L-triptofano, arabinosa, celulosa, dextrina, glucosa, lactosa, maltosa, manitol, ramnosa, sacarosa, sucrosa, xilosa, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido acético, ácido maleico, adenina, almidón, anilina, fenol, glicerina, Tween 80, Inositol, p-amino-benzoico o ácido nicotínico) en 1L de agua destilada.

Buffer de fosfato 5 mM con resazurina: K_2HPO_4 0,87 g y KH_2PO_4 0,42 g (pH 7,2) en 1 L de agua destilada, con el agregado de la solución madre de resazurina al 0,1 % v/v.

Solución de fuente de carbono en buffer de fosfato 5 mM con resazurina (Solución II): Se disuelven 0,4 mL de una Solución I de fuente de carbono en 6,6 mL de Buffer fosfato con resazurina. De esta manera la concentración de cada fuente de carbono en la Solución II es de aproximadamente 57 mg/L.

Todas las soluciones fueron esterilizadas por el método de filtración a través de membranas de acetato de celulosa 0,22 μm de tamaño de poro y conservadas a 4 °C.

3.4 Compuestos químicos y parámetros de control

Todos los compuestos químicos empleados fueron de grado analítico. La atrazina y el 2,4-D fueron provistos por Fluka (Buchs, Suiza). Tanto las sales como las vitaminas fueron provistas por Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos).

• *Curvas de calibración*

La determinación de atrazina se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector UV (Shimadzu, Japón) a 220 nm. Se empleó una columna de carbono C18 (VP-ODS 150L x 4,6 cm) a una temperatura de 25 °C. Se realizaron dos curvas de calibración: una para cuantificar concentraciones de 10 a 100 µg/L de atrazina (Figura 3-5.A) y otra para concentraciones mayores a 100 µg/L (Figura 3-5.B). Se utilizó como blanco agua deionizada. Las condiciones de la corrida cromatográfica fueron: corrida isocrática, flujo de fase móvil: 1 mL/min, composición fase móvil: Metanol/ Agua (60/40%), tiempo de corrida: 10 min, volumen de inyección: 20 µL, tiempo de retención: 7,4 min.

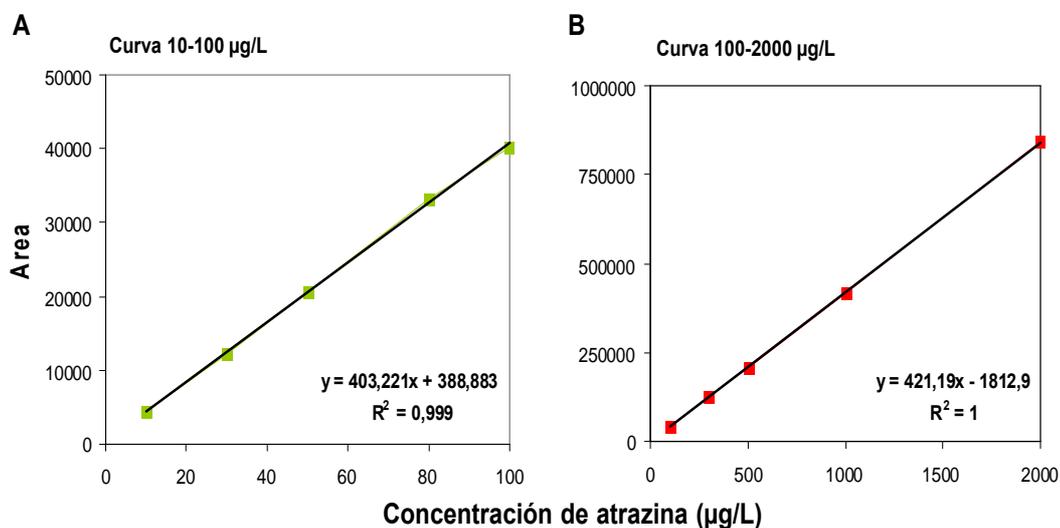


Figura 3-5. Curvas de calibración de atrazina por HPLC. A) Rango 10-100 µg/L y B) Rango 100- 2000 µg/L.

La determinación del 2,4-D se realizó por espectrofotometría UV empleando un espectrofotómetro (UV-Visible 2450 Shimadzu, Japón). La longitud de onda de absorción óptima para 2,4-D fue 283 nm. Se efectuaron dos curvas de calibración a fin de asegurar

la linealidad para la cuantificación. Para ello se realizó una curva de 5 a 100 mg/L (Figura 3-6.A) y otra para el rango de 50 a 500 mg/L de 2,4-D (Figura 3-6.B).

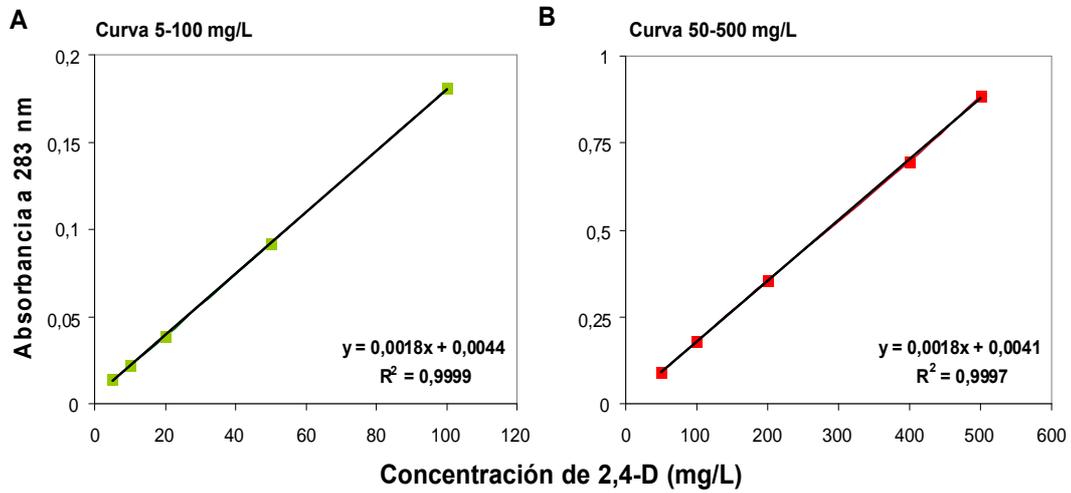


Figura 3-6. Curvas de calibración del 2,4-D por espectrofotometría UV a 283 nm. A) Rango 5-100 mg/L y B) Rango 50-500 mg/L.

4- RESULTADOS

4.1 Determinación de la presencia de atrazina y 2,4-D en muestras de agua del embalse Los Molinos

Para determinar la presencia de atrazina y 2,4-D en el agua del embalse Los Molinos durante los monitoreos estacionales se extrajeron muestras en el sitio de la desembocadura de río Los Reartes (DLR) el cual atraviesa la zona con mayor actividad agrícola. En ninguna de las muestras analizadas (correspondientes a los monitoreos 2010 a 2011) se detectó atrazina o 2,4-D por encima del límite de cuantificación de las técnicas implementadas. Por ello se tomaron muestras adicionales en el curso del río Los Reartes hallando atrazina en las muestras de otoño de 2010 y 2011 en una concentración de 8 y 12 µg/L respectivamente (se adjunta cromatograma de la muestra de 12 µg/L de atrazina, Figura I.6.2 del ANEXO I).

Dado que no fue detectado el 2,4-D en ninguna de las muestras analizadas, aunque las fichas fitosanitarias confirman su frecuente utilización, se recurrió al empleo de la modelación de dispersión de pesticidas SoilFug a fin de estimar el comportamiento de ambos herbicidas y sus posibles concentraciones en agua de escorrentía de la zona con actividad agrícola. Dicho análisis predice que el 2,4-D se hallaría en concentraciones muy por debajo del límite de cuantificación del método analítico utilizado, mientras que la atrazina se hallaría en un rango de concentraciones cuantificables tal como se demostró experimentalmente. En el ANEXO I se presenta como estudio complementario la aplicación y el análisis de la modelación.

4.2 Determinación de la biomasa y la viabilidad bacteriana en ensayos de exposición a atrazina y 2,4-D

4.2.1 Recuentos de bacterias heterótrofas cultivables

Se determinó el número de bacterias heterótrofas cultivables (BHC) en muestras tomadas al inicio (T_0), a la hora (T_1), a las 24 (T_{24}) y a las 120 (T_{120}) horas de los ensayos de tolerancia a atrazina y 2,4-D. Los resultados se presentan en las Figuras 4-1 y 4-2.

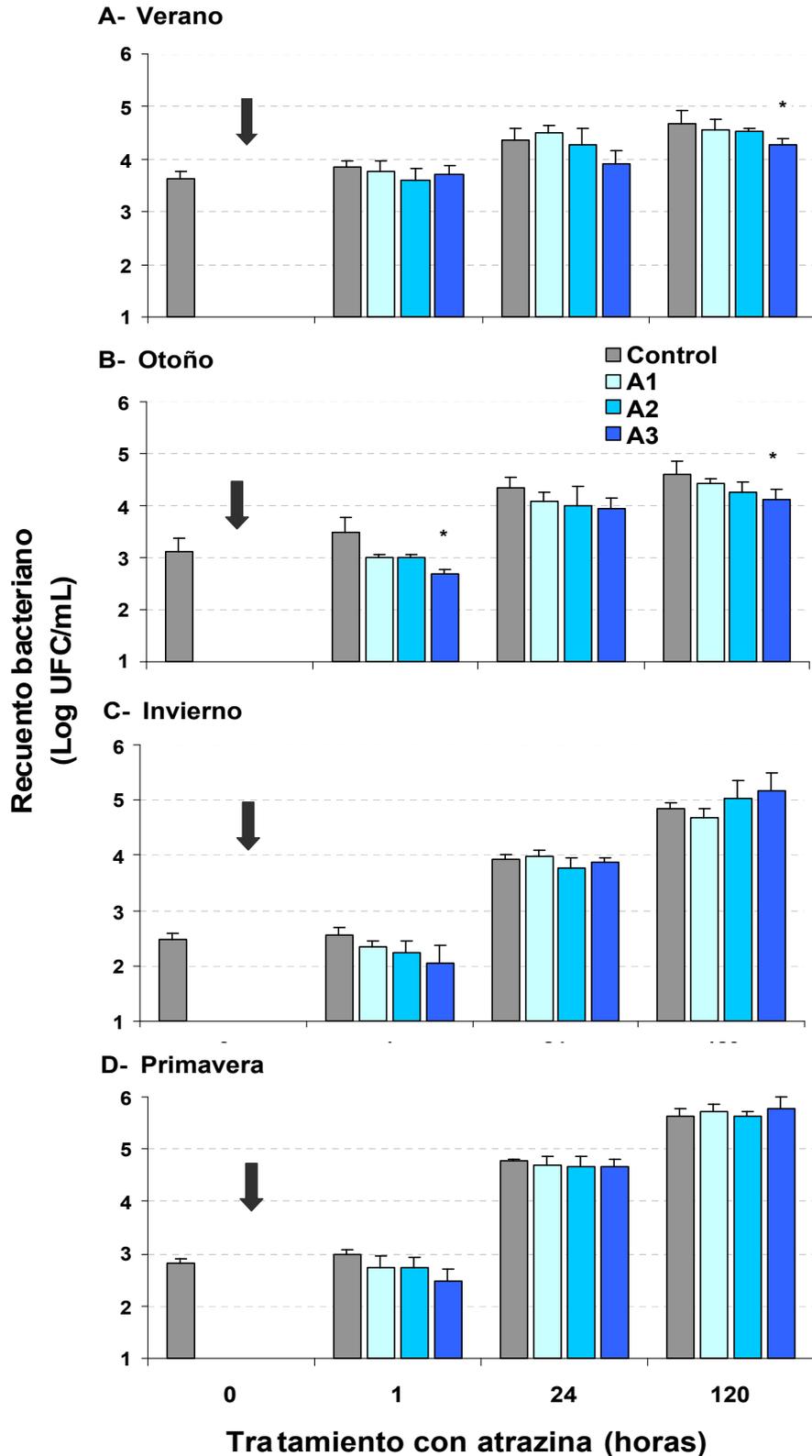


Figura 4-1. Recuentos de bacterias heterótrofas cultivables (BHC) expuestas a atrazina a T_0 , T_1 , T_{24} y T_{120} del ensayo de tolerancia. Tratamientos con atrazina: A1) 0,02 mg/L; A2) 0,2 mg/L y A3) 2 mg/L, respecto a un control sin compuesto (Control) en las estaciones: (A) verano, (B) otoño, (C) invierno y (D) primavera. Las barras representan el desvío estándar (DS) de la media (n=6). Se utilizó ANOVA de un factor y el test de Tukey. Diferencias significativas: (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,01$; (***) $P < 0,001$. La flecha representa la adición del compuesto

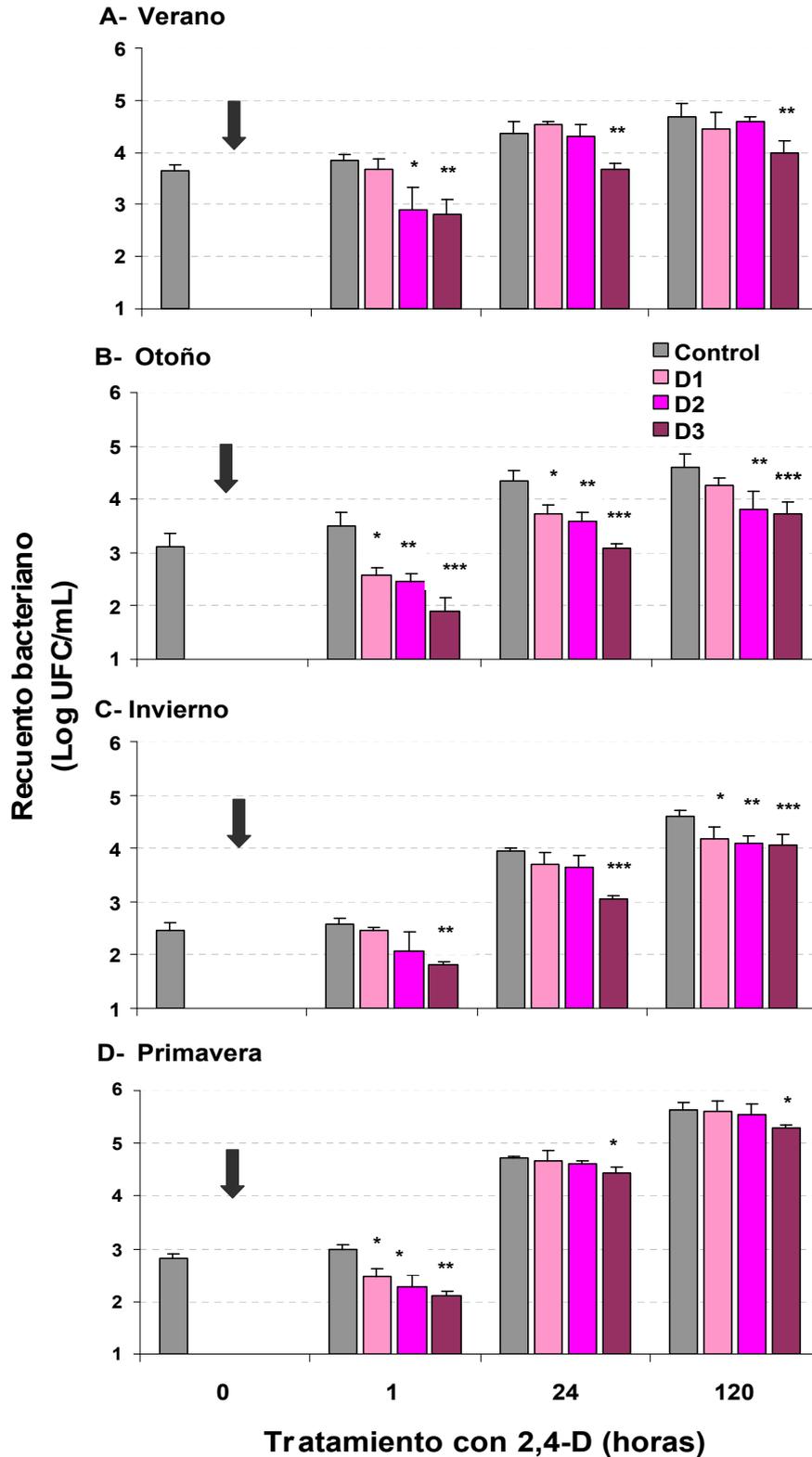


Figura 4-2. Recuentos de bacterias heterótrofas cultivables (BHC) expuestas a 2,4-D a T₀, T₁, T₂₄ y T₁₂₀ del ensayo de tolerancia. Tratamientos con 2,4-D: D1) 2 mg/L, D2) 20 mg/L y D3) 200 mg/L respecto a un control sin compuesto (Control) en las estaciones: (A) verano, (B) otoño, (C) invierno y (D) primavera. Las barras representan el desvío estándar (DS) de la media (n=6). Se utilizó ANOVA de un factor y el test de Tukey. Diferencias significativas: (*) P < 0,05; (**) P < 0,01; (***) P < 0,001. La flecha representa la adición del compuesto

Los resultados de los recuentos bacterianos de los controles obtenidos al inicio de los ensayos de tolerancia (T_0) en las diferentes estaciones del año, permitieron demostrar que los mismos variaron en un orden de magnitud, hallando el recuento más alto en verano ($4,5 \times 10^3$ UFC/mL) y el más bajo en invierno ($3,1 \times 10^2$ UFC/mL). Luego de 120 horas (T_{120}) se obtuvo un crecimiento bacteriano en los controles que alcanzaron valores promedio de $5,1 \times 10^4$; $4,4 \times 10^4$; $4,1 \times 10^4$ y $4,4 \times 10^5$ UFC/mL, en las muestras de verano, otoño, invierno y primavera respectivamente (Figuras 4-1 y 4-2).

Sólo se obtuvieron diferencias significativas entre los recuentos bacterianos de las muestras expuestas a la concentración más alta de atrazina (A3) a T_{120} en las muestras extraídas en verano y en otoño para las cuales el valor promedio del recuento de bacterias fue de $1,9 \times 10^4$ y $7,6 \times 10^3$ UFC/mL (ANOVA, $P < 0,05$).

En la Figura 4-2 se presentan los resultados de los tratamientos con 2,4-D. En el ensayo de tolerancia de la estación de verano los recuentos bacterianos de la muestra D3 (200 mg/L) fueron significativamente menores tanto a T_1 ($7,6 \times 10^2$ UFC/mL), T_{24} ($4,8 \times 10^3$ UFC/mL) como a T_{120} ($1,1 \times 10^4$ UFC/mL) respecto al control ($5,5 \times 10^3$ UFC/mL a T_1 , $2,6 \times 10^4$ UFC/mL a T_{24} y $5,1 \times 10^4$ UFC/mL a T_{120}) (ANOVA, $P < 0,01$). Asimismo en los ensayos efectuados con las muestras extraídas en otoño, luego de una hora de exposición al compuesto (T_1), como a T_{24} y T_{120} se halló una disminución significativa en los recuentos bacterianos en todas las muestras tratadas con 2,4-D respecto al control de manera inversamente proporcional al incremento de la concentración. Los valores de los recuentos a T_{120} fueron $8,0 \times 10^3$ UFC/mL para la muestra D2 y $5,4 \times 10^3$ UFC/mL para D3 mientras que el control presentó un valor de $4,4 \times 10^4$ UFC/mL.

En el ensayo realizado con las muestras de invierno se obtuvieron diferencias significativas sólo en la muestra D3 a T_1 y T_{24} . Mientras que a T_{120} todas las muestras que fueron expuestas a diferentes concentraciones de 2,4-D fueron significativamente menores respecto al control. Los valores de las medias fueron significativamente menores comparado con los recuentos bacterianos del control ($4,2 \times 10^4$ UFC/mL) siendo los valores de los recuentos en las muestras D1, D2 y D3, $1,7 \times 10^4$; $1,3 \times 10^4$ y $1,3 \times 10^4$ UFC/mL (ANOVA, $P < 0,05$).

En el ensayo de tolerancia correspondiente a la estación de primavera se hallaron diferencias estadísticas a T_1 entre las tres muestras tratadas con 2,4-D y el control. A T_{24} y T_{120} solo la muestra D3 presentó diferencias significativas respecto al control siendo los valores a T_{24} $2,5 \times 10^4$ UFC/mL y a T_{120} $1,9 \times 10^5$ UFC/mL ($P > 0,05$).

Se midió la concentración de atrazina y de 2,4-D durante el desarrollo del ensayo de tolerancia para evaluar posibles pérdidas abióticas o degradación biológica de los herbicidas. Se comprobó que no hubo remoción durante las 120 horas en que se realizaron los ensayos de exposición.

4.2.2 Comparación entre el número de bacterias heterótrofas cultivables viables y el de bacterias tolerantes

Con el objetivo de determinar el número bacterias heterótrofas tolerantes (BHtol) a atrazina y a 2,4-D a T₁₂₀ del ensayo de tolerancia se realizaron recuentos adicionales en placas de Petri conteniendo agar R2A con el agregado de 0,02, 0,2 y 2 mg/L de atrazina o 2, 20 y 200 mg/L de 2,4-D dependiendo del ensayo. Los resultados obtenidos fueron comparados con los recuentos de bacterias heterótrofas viables (BHC) correspondientes a T₁₂₀ del ensayo de tolerancia, presentados previamente (Figura 4-3).

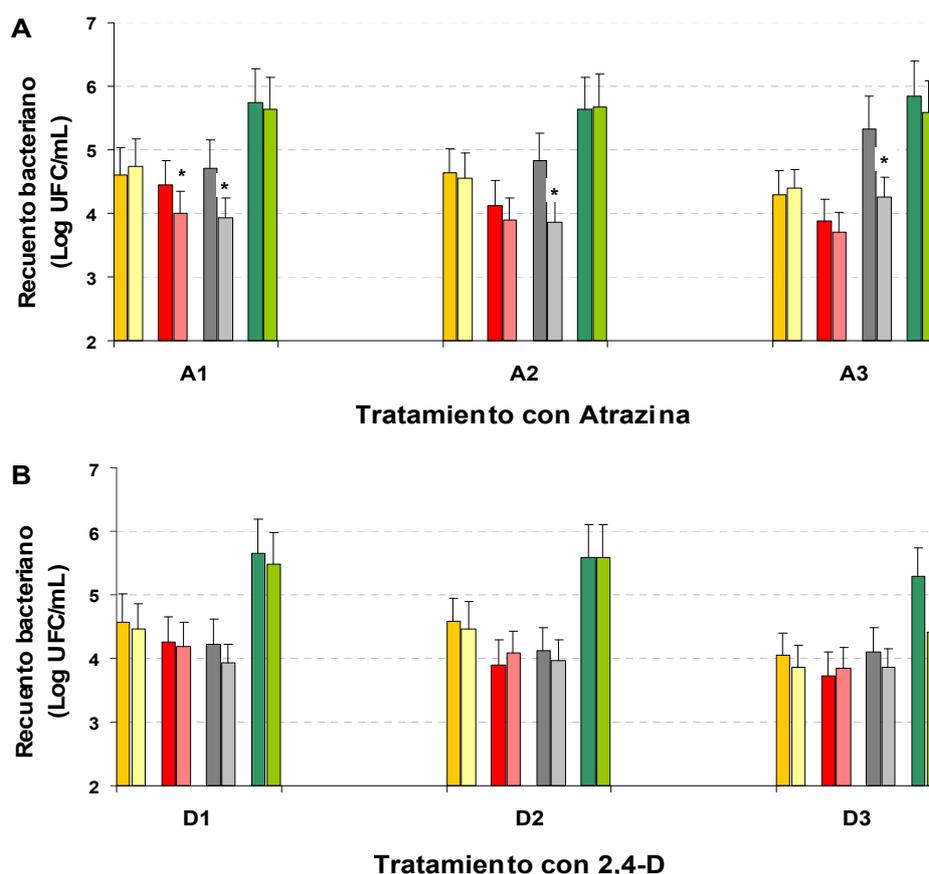


Figura 4-3. Comparación de los recuentos de bacterias heterótrofas cultivables (BHC) y de bacterias tolerantes (BHtol) crecidas en agar R2A suplementado con (A) atrazina o (B) 2,4-D (D). Tratamientos con atrazina: A1 (0,02 mg/L); A2 (0,2 mg/L) y A3 (2 mg/L); y con 2,4-D: D1 (2 mg/L), D2 (20 mg/L) y D3 (200 mg/L). Análisis de las muestras tomadas de los ensayos de exposición a T₁₂₀ de verano (BHC-■, BHtol-■), otoño (BHC-■, BHtol-■), invierno (BHC-■, BHtol-■) y primavera (BHC-■, BHtol-■). Se utilizó ANOVA de un factor y el test *a posteriori* de Tukey. Diferencias estadísticas (*) P<0,05 dentro del par BHC-BHtol.

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, $P > 0,05$) entre los recuentos de BHC y de BHTol en las muestras extraídas en otoño que fueron expuestas a la concentración mas baja de atrazina (A1) y en todas las muestras tratadas con atrazina (A1, A2 y A3) del ensayo de tolerancia correspondiente a invierno (Figura 4-3.A).

Las muestras que fueron expuestas a 2,4-D no presentaron diferencias significativas entre BHC y BHTol.

4.2.3 Secuenciación e identificación de los aislamientos de las bacterias tolerantes a atrazina y 2,4-D

Se seleccionaron 18 colonias bacterianas tolerantes a atrazina y a 2,4-D con características morfológicas diferentes. Como primera caracterización se realizó una tinción de Gram obteniendo 16 colonias Gram negativas y dos Gram positivas. Los resultados de la identificación se presentaron en la Tabla 4-1.

Tabla 4-1. Secuenciación e identificación de las colonias seleccionadas tolerantes a atrazina y 2,4-D. Las secuencias fueron analizadas utilizando el programa *Classifier* en el sitio del RDP II con un nivel de confianza de al menos 80% ⁽¹⁾ y la función BLAST en la base de datos del NCBI ⁽²⁾.

NOMBRE AISLAMIENTO	CEPA TOLERANTE (Atrazina/ 2,4-D)	FILIACIÓN FILOGENÉTICA (Orden/Clase) (RDP II) ⁽¹⁾	HOMOLOGÍA DE SECUENCIA	SECUENCIA IDENTIFICADA (GenBank) ⁽²⁾
AR-1	A	Alpha Proteobacteria/ Caulobacterales	100%	<i>Brevundimonas</i> sp. Shira
AR-4	A	Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales	100%	<i>Pseudomonas salomonii</i>
AR-10	A	Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales	100%	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
AR-12	A	Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales	100%	<i>Pseudomonas putida</i>
AR-20	A	Firmicutes/ Bacilli	100%	<i>Staphylococcus</i> sp. MOLA 313
AR-8	A y D	Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales	100%	<i>Pseudomonas salomonii</i>
AR-16	A y D	Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales	100%	<i>Pseudomonas</i> sp. G10.5
AR-18	A y D	Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales	100%	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
AR-21	A y D	Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales	100%	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
AR-6	D	Alpha Proteobacteria/ Sphingomonadales	100%	<i>Blastomonas natatoria</i>
AR-7	D	Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales	100%	<i>Pseudomonas</i> sp. ZnO-2
AR-14	D	Bacteroidetes/ Flavobacteriales	100%	<i>Uncultured bacterium</i>
AR-15	D	Bacteroidetes/ Flavobacteriales	100%	<i>Flavobacterium</i> sp.
AR-22	D	Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales	100%	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
AR-26	D	Actinobacteria/ Actinomycetales	100%	<i>Microbacterium</i> sp. XZL01

Atrazina (A), 2,4-D (D). NCBI- National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

De las 18 colonias aisladas, pudieron ser secuenciadas sólo 15 de las cuales 14 presentaron un alto porcentaje de similitud de secuencias lo cual permitió la designación

taxonómica. En base a las secuencias registradas en el GenBank, pudieron discriminarse a nivel de especie sólo 8 colonias. De esta manera, se halló que cuatro colonias resultaron ser la misma especie de *Pseudomonas fluorescens* y dos cepas aisladas correspondieron a la especie de *P. salomonii*. Por tanto el género más abundante fue *Pseudomonas* seguido del género *Flavobacterium*. Otros géneros bacterianos identificados fueron *Staphylococcus*, *Blastomonas*, *Brevundimonas* y *Microbacterium*, con una sola especie representante en cada caso. Las bacterias Gram positivas fueron identificadas como pertenecientes a los géneros a los géneros de *Staphylococcus* y *Microbacterium*.

Por otra parte del total de las colonias seleccionadas (15), cinco de ellas fueron tolerantes a atrazina y seis tolerantes a 2,4-D exclusivamente, mientras que sólo 4 cepas resultaron ser tolerantes a ambos compuestos (Tabla 4-1) todas ellas pertenecientes al género de *Pseudomonas*.

Con el fin de ilustrar los cambios morfológicos que se observaron al finalizar los ensayos de tolerancia (T_{120}) se presenta a modo de ejemplo en la Figura III.A del ANEXO III, fotografías de colonias crecidas provenientes del control y de muestras tratadas con la concentración más alta de atrazina (A3) y de 2,4-D (D3) al finalizar el ensayo de tolerancia. Dichas fotografías corresponden a muestras extraídas en la estación de verano de 2010. De la observación directa se verifica que los tipos de colonia que predominan luego del ensayo en cada tratamiento difieren respecto al control y entre sí

4.2.4 Comparación entre el número de bacterias heterótrofas cultivables viables y el número de bacterias totales

A fin de evaluar el efecto diferencial de la exposición a los herbicidas sobre diferentes grupos bacterianos se comparó el número de las bacterias totales (BT), obtenido por microscopia de epifluorescencia, con el recuento de bacterias heterótrofas cultivables (BHC), presentado anteriormente en las muestras tomadas a T_0 y T_{120} de los ensayos de tolerancia

En la Figura 4-4 se presentan los resultados de la comparación de los recuentos de BHC y BT de los controles y las muestras que fueron expuestas a atrazina y a 2,4-D de los ensayos de tolerancia correspondientes a las estaciones de verano (Figura 4-4.A), otoño (Figura 4-4.B), invierno (Figura 4-4.C) y primavera (Figura 4-4.D). Además, se presenta en cada Figura la relación BHC/BT expresada en términos de porcentaje.

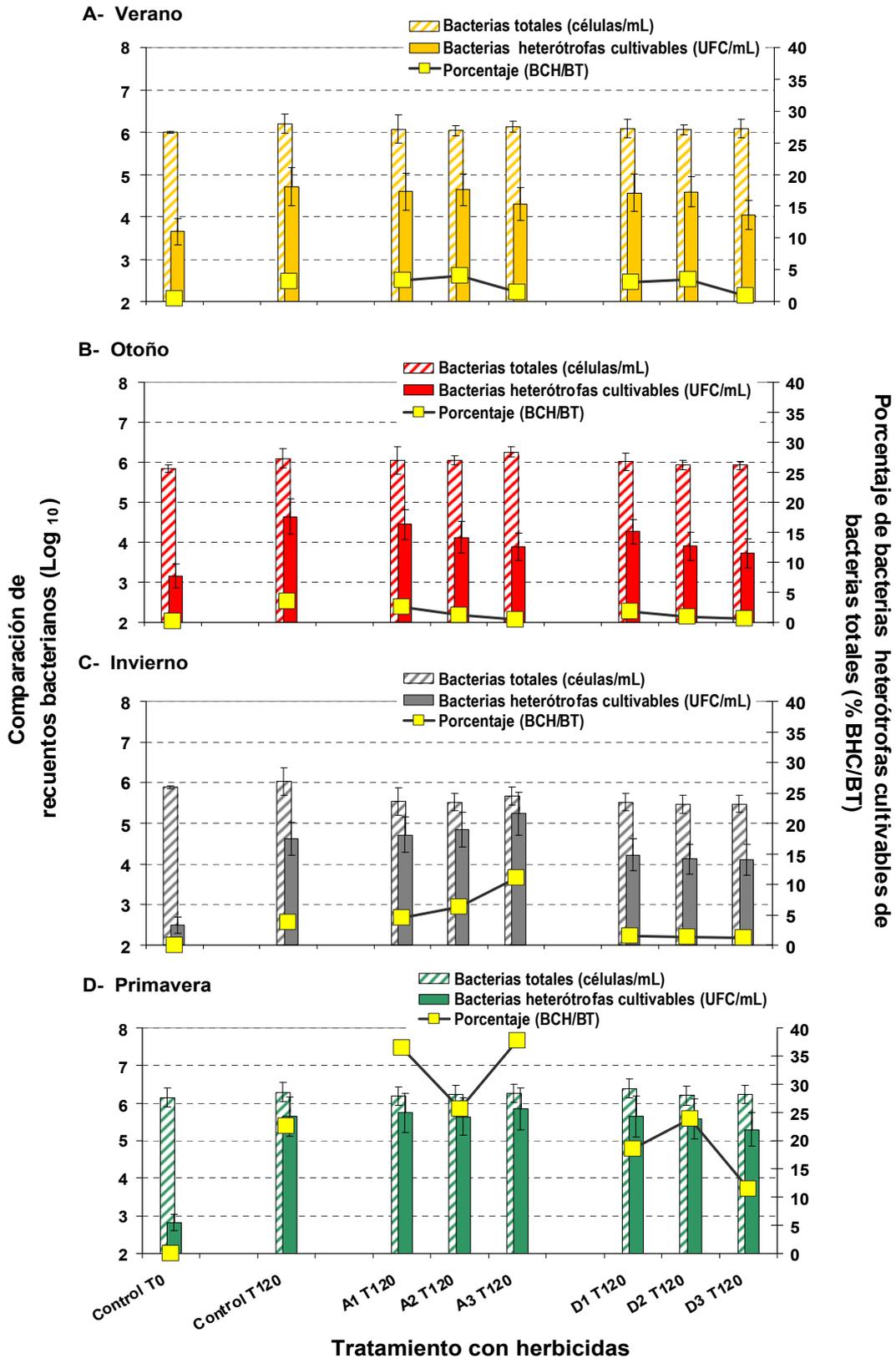


Figura 4-4. Enumeración de BT (☐) y recuentos en placa de Petri de BHC (■). Se comparan los controles a T₀ y T₁₂₀ y las muestras expuestas a atrazina y a 2,4-D a T₁₂₀ de los ensayos de las estaciones de verano (A), otoño (B), invierno (C) y primavera (D). Diferencias estadísticas (*) P<0,05. ANOVA de un factor y el test a posteriori de Tukey.

Al inicio del ensayo de tolerancia (T_0) el número de bacterias totales (BT) presentes en los controles variaron entre $6,9 \times 10^5$ a $1,4 \times 10^6$ bacterias/mL hallando el valor más bajo en las muestras extraídas en otoño, y el valor más alto en las muestras de primavera. Las diferencias entre los valores del número de BHC y BT de los controles a T_0 variaron en alrededor de dos ordenes de magnitud. Además, el porcentaje de BHC respecto a BT en los controles de los ensayos de verano, otoño, invierno y primavera fue 0,5; 0,2; 0,04 y 0,05%, respectivamente (Figura 4-4).

El número promedio de BT en los controles obtenidos a T_{120} fue $1,08 \times 10^6$ bacterias/mL en las muestras provenientes de la estación de invierno y $1,96 \times 10^6$ bacterias/mL en las muestras de primavera, siendo estos valores el más bajo y más alto respectivamente.

Los porcentajes de BHC respecto a BT obtenidos a T_{120} aumentaron a 3,2; 3,5 y 3,8% en los controles de los ensayos de tolerancia de verano, otoño e invierno respectivamente, mientras que en el ensayo de primavera ésta relación llegó a 22,6%.

El número de BT en las muestras tratadas con atrazina y 2,4-D a T_{120} se halló en el orden de 10^6 bacterias/mL, excepto en las muestras D2 y D3 del ensayo correspondiente a otoño donde el crecimiento de BT presentó valores más bajos, $8,6$ y $8,5 \times 10^5$ bacterias/mL, respectivamente.

En los ensayos de tolerancia correspondientes a verano y otoño los porcentajes de BHC respecto a BT de las muestras que fueron expuestas a atrazina presentaron valores menores a medida que se incrementó la concentración del herbicida. El porcentaje en A1 fue de 3,3%, en A2 de 2% y en A3 de 1,5% correspondientes a verano (Figura 4-4.A). En los correspondientes a otoño los porcentajes fueron 2,5%, 1,2% y 0,4% en A1, A2 y A3 respectivamente (Figura 5-7.B).

Los porcentajes obtenidos al finalizar los ensayos correspondientes a invierno fueron de 4,5%, 6,3%, y 11%, en A1, A2 y A3 respectivamente (Figura 4-4.C).

En el ensayo correspondiente a primavera los porcentajes fueron todos mayores respecto al control (36,4; 25,6 y 37,8% para A1, A2 y A3 respectivamente) (Figura 4-4.D).

En las muestras que fueron expuestas a las diferentes concentraciones de 2,4-D la relación BHC/BT fue progresivamente menor a mayor concentración de herbicida. En el ensayo de tolerancia correspondiente a verano los porcentajes obtenidos fueron 3,0; 3,4 y 0,9% en las muestras D1, D2 y D3 respectivamente (Figura 4-4.A). En los ensayos correspondientes a otoño e invierno la relación BHC/BT fue menor en las muestras

tratadas respecto al control. Los valores para otoño fueron 1,8; 0,9 y 0,6% en las muestras D1, D2 y D3 respectivamente; y para invierno fueron 1,5; 1,3 y 1,2% en las muestras D1, D2 y D3 respectivamente (Figura 4-4.B-C).

En el ensayo correspondiente a primavera los porcentajes fueron 18,5 y 23,8% para D1 y D2 resultando similares al control (22,6%), mientras que en la muestra D3 el valor fue de 11,4% (Figura 4-4.D).

4.2.5 Determinación de la viabilidad bacteriana mediante citometría de flujo

Con el fin de determinar cambios en la viabilidad/mortalidad de las bacterias presentes en las muestras tomadas a T_{120} provenientes de los ensayos de tolerancia a atrazina y a 2,4-D de las distintas estaciones del año se utilizó la técnica de citometría de flujo conjuntamente con el *kit* de viabilidad (*Cell Viability Kit* -BD). Tal como se presentó en Materiales y Métodos, para la calibración del método y el análisis citométrico se utilizó un cultivo puro de *Pseudomonas putida*, previamente seleccionada.

A partir de la representación gráfica de PercP-H versus FitC-H, se estimó el número de bacterias de las categorías: “Vivas-Activas”, “Vivas-No activas”, “Injuriadas” y “Muertas”/mL respecto a número total de eventos. Se presenta en la Figura 4-5 y a modo de ejemplo los citogramas obtenidos en el ensayo de tolerancia correspondiente a verano tanto de los controles a T_0 y T_{120} como las muestras que fueron tratadas con atrazina y 2,4-D a T_{120} . Los citogramas correspondientes a las restantes estaciones se presentan en el ANEXO III.

A partir del análisis de los citogramas se calcularon los porcentajes de los diferentes estados celulares de los controles a T_0 y T_{120} , así como las muestras que fueron expuestas a atrazina y a 2,4-D tomadas a T_{120} de los ensayos de tolerancia correspondientes a verano, otoño, invierno y primavera. Estos resultados se presentan en la Figura 4-6.

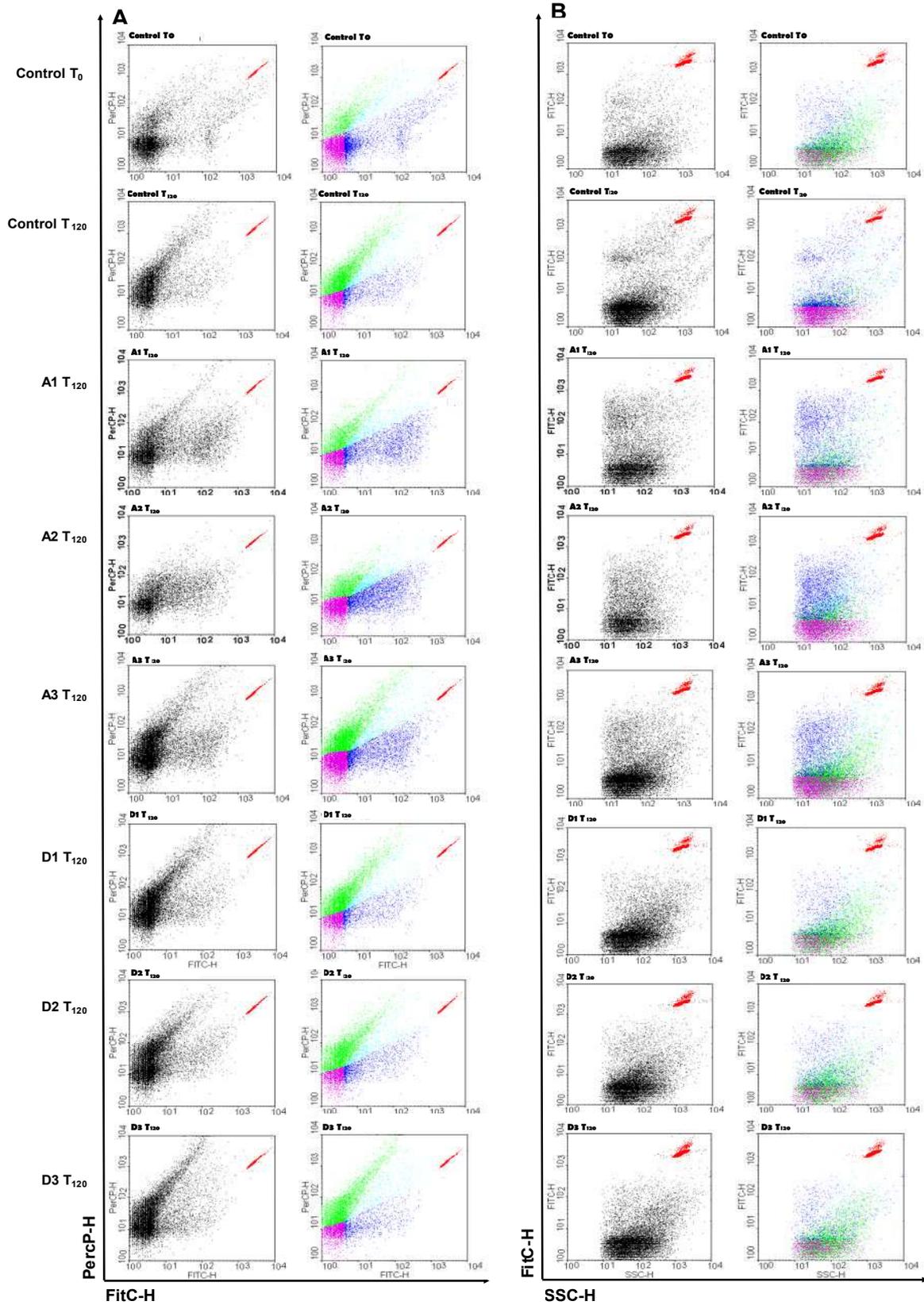


Figura 4-5. Citogramas correspondientes al ensayo de tolerancia de verano. Se grafican los parámetros PercP-H vs. FitC-H (Gráficos A) y FitC-H vs. SSC-H (Gráficos B). Por cada muestra se representa el citograma solo y los agrupamientos por estado metabólico: bacterias Muertas (verde), Injuriadas (celeste), Vivas-activas (azul) y Vivas-no activas (rosa).

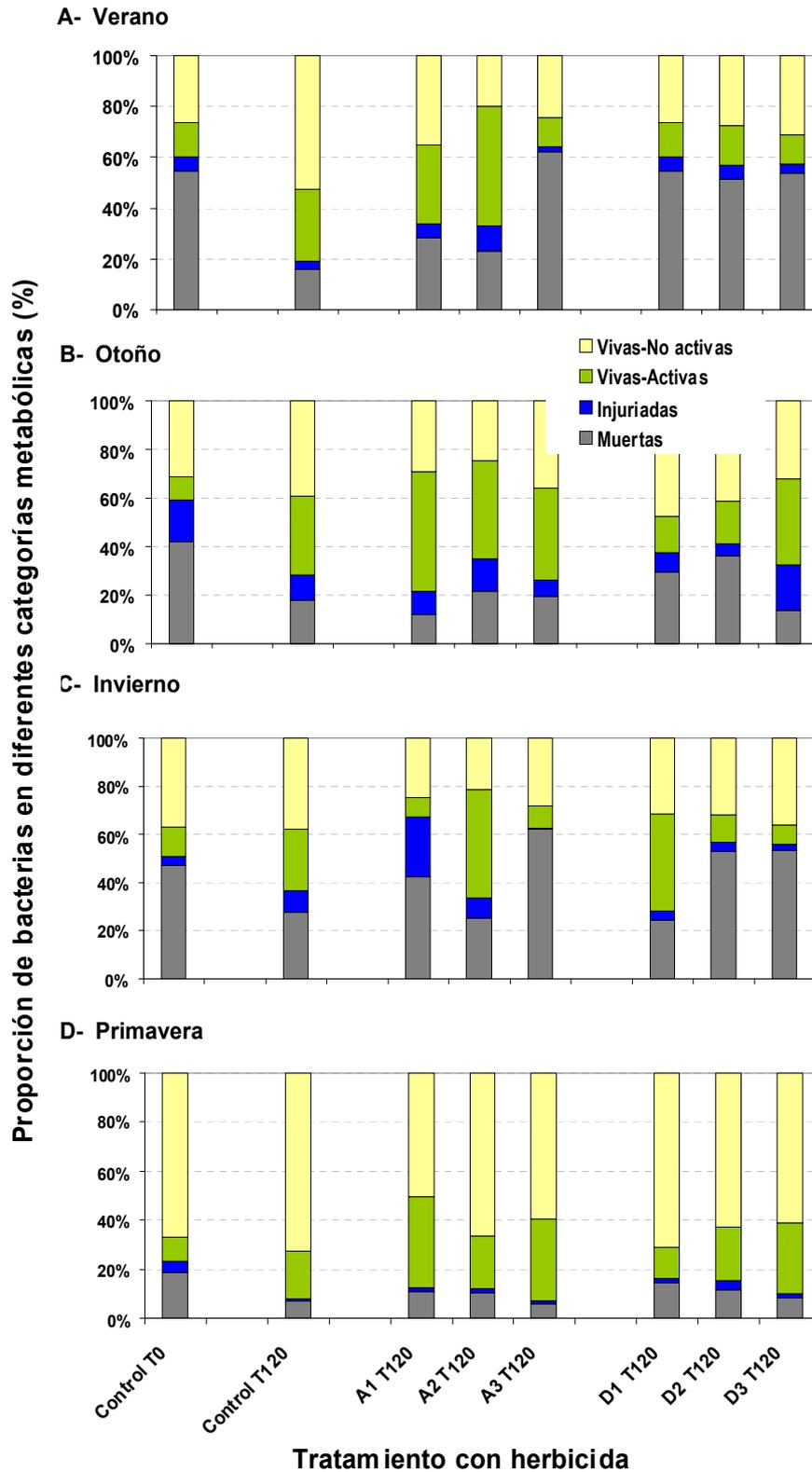


Figura 4-6. Análisis por citometría de flujo de muestras provenientes de los ensayos de exposición a atrazina y 2,4-D de (A) verano, (B) otoño, (C) invierno y (D) primavera. Se analizan los controles a T₀ y T₁₂₀ y de los grupos tratados con herbicidas a T₁₂₀. Se representan los porcentaje de las categorías: bacterias Muertas (■), Injuriadas (■), Vivas-Activas (■) y Vivas-No activas (■).

En los controles de los ensayos correspondientes a cada estación del año el porcentaje de bacterias “Muertas” fue mayor en las muestras tomadas a T₀ en relación con las tomadas a T₁₂₀, pasando de 54,7 a 15,8% en la muestra de verano, de 42,3 a 17,8% en la de otoño, de 46,9 a 27,7% en la de invierno y de 18,5 a 7,1% en la de primavera. En cambio, en los porcentajes de bacterias de la categoría “Vivas-Activas” se observó un crecimiento en todas las estaciones, pasando de 13,4 a 28,2% en la muestra de verano, de 9,6 a 32,5% en la de otoño, de 12,1 a 25,6% en la de invierno y de 9,9 a 19,4% en la de primavera. Tanto la categoría de células “Injuriadas” como la de “Vivas-No activas” presentaron pequeñas variaciones en los porcentajes al comparar las muestras tomadas a T₀ con las tomadas a T₁₂₀, excepto en la muestra de verano donde se observó un incremento de bacterias “Vivas-No activas” que se duplicaron a T₁₂₀.

A T₁₂₀ en el ensayo correspondiente a verano (Figura 4-6.A) las muestras que recibieron el tratamiento con atrazina mostraron porcentajes altos de bacterias “Muertas” e “Injuriadas” respecto a los valores del control. Las muestras tratadas con las concentraciones bajas e intermedias de atrazina (A1 y A2) mostraron porcentajes similares de bacterias “Muertas” (28,2% y 23,3% respectivamente), aunque el valor más alto lo exhibió la muestra A3 (62,3%). Los porcentajes de bacterias “Vivas-Activas” fueron relativamente similares entre el control y las muestras A1 y A2 (31 y 47%) mientras que A3 mostró porcentajes más pequeños (11,7%). En todas las muestras tratadas con 2,4-D revelaron porcentajes similares para todas las categorías evaluadas, siendo el valor de la categoría de las bacterias “Muertas” el más alto respecto al control. Los porcentajes de las bacterias “Muertas” de las muestras expuestas a 2,4-D oscilaron entre 51,4 a 54,7%. En el caso de las bacterias en la categoría “Vivas-Activas” presentaron valores más bajos respecto al control, aunque similares entre sí (13,4, 15,8 y 11,4% para D1, D2 y D3, respectivamente).

En el ensayo de tolerancia realizado con las muestras de otoño (Figura 4-6.B) aquellas que fueron expuestas a atrazina mostraron porcentajes altos en la categoría de bacterias “Vivas-Activas” con valores que oscilaron entre 49,4% en A1 y 38% en A3. Ambos valores fueron los más elevados respecto al control (32,5%). Las categorías de bacterias “Muertas” e “Injuriadas” dieron valores similares que oscilaron entorno al valor del control. Ambas categorías mostraron los valores más bajos con promedios de $17,75 \pm 4,15 \%$ y $9,8 \pm 2,8\%$, respectivamente. Las bacterias identificadas como “Vivas-No activas” mostraron valores menores de porcentajes respecto al del control (39%), siendo la muestra A1 la de menor valor (29,2%). Las muestras D1 y D2 mostraron porcentajes

mayores respecto al control para las categorías de bacterias “Muertas” (29,5 y 36,3%) y “Vivas-No activas” (47,5 y 41,4%), mientras que los porcentajes de la categoría “Vivas-Activas” presentaron los valores más bajos (15 y 17%). Contrariamente la muestra D3 presentó valores similares al control en todas las categorías.

En el ensayo correspondiente a invierno (Figura 4-6.C) las muestras que recibieron tratamiento con atrazina, A1 (28,7%) y A3 (49%), así como las muestras tratadas con 2,4-D, D2 (38,3%) y D3 (39%) exhibieron valores altos para la categoría de bacterias “Muertas” respecto al valor del control a T_{120} (27,7%). Por otro lado, las muestras A2 y D1 si bien exhibieron porcentajes menores en la categoría de bacterias “Muertas”, mostraron porcentajes mayores de bacterias “Vivas-activas” (31,2 y 29,7%, respectivamente) respecto al porcentaje determinado en el control a T_{120} (7,38%).

En el ensayo correspondiente a primavera (Figura 4-6.D) todas las muestras tratadas con herbicidas y el control a T_{120} mostraron una alta similitud en los valores porcentuales de cada categoría. Para la categoría bacterias “Vivas-No activas” estos valores oscilaron desde el valor mínimo de 50,2% en A1 al valor máximo de 71% en D1. Por otra parte, las categorías de bacterias “Muertas” e “Injuriadas” mostraron los porcentajes más bajos en comparación con las demás categorías en todas las muestras control y tratadas.

En las muestras tratadas con concentraciones bajas e intermedias de atrazina (A1 y A2) aumentaron los porcentajes de bacterias “Vivas-Activas” en los ensayos correspondientes a verano, otoño y primavera comparados con sus controles a T_{120} . No se observó un variación similar para las muestras de invierno. En las muestras que recibieron la concentración más alta de atrazina (A3) se observaron los porcentajes más altos de mortalidad en las estaciones de verano e invierno. De la comparación de las muestras tratadas con atrazina y 2,4-D respecto al control a T_{120} en primavera mostraron que los porcentajes calculados dentro de cada categoría fueron similares. Cabe señalar que en estas muestras se destacó que los agrupamientos de bacterias en la categoría “Vivas-No activas” mostraron los porcentajes más altos respecto a las restantes categorías.

Esta relación de porcentajes puede ser subjetiva pero al complementarse con la información que ofrece los gráficos de FitC-H versus SSC-H (Figura 4-5 y Figuras III.B del ANEXO III), se puede comprobar que además de cambiar la ubicación en el citograma de cada agrupamiento, también se observan cambios en el biovolumen de las bacterias (tamaños).

4.2 Evaluación de la estructura genética de las comunidades bacterianas

4.2.1 Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante - DGGE

Con el objetivo de determinar cambios en la estructura de las comunidades bacterianas como resultado de haber sido expuestas a atrazina y 2,4-D, se realizó un análisis molecular mediante la técnica PCR-DGGE de las muestras tomadas de los ensayos de tolerancia a los herbicidas tanto a T_0 como T_{120} .

Se analizaron los patrones de bandas de los DGGE y los respectivos dendrogramas de similitud de las muestras extraídas en los ensayos de tolerancia de verano (Figuras 4-7), de otoño (Figuras 4-8), de invierno (Figuras 4-9) y de primavera (Figuras 4-10). En cada Figura se presentan por un lado las muestras que fueron expuestas a atrazina (Gráfico A) y por el otro las muestras que recibieron el tratamiento con 2,4-D (Gráfico B). En el Gráfico C se presenta el número de bandas identificadas de cada perfil de DGGE, utilizado como estimador de la riqueza genética, y los valores de los índices de diversidad de Shannon-Weaver (H'), que permiten estimar la biodiversidad genética presente en cada muestra.

Cabe señalar que se utilizará la definición de control a T_5 , indicando los 5 días de incubación, como equivalente de control a T_{120} el cual indica la duración de 120 horas.

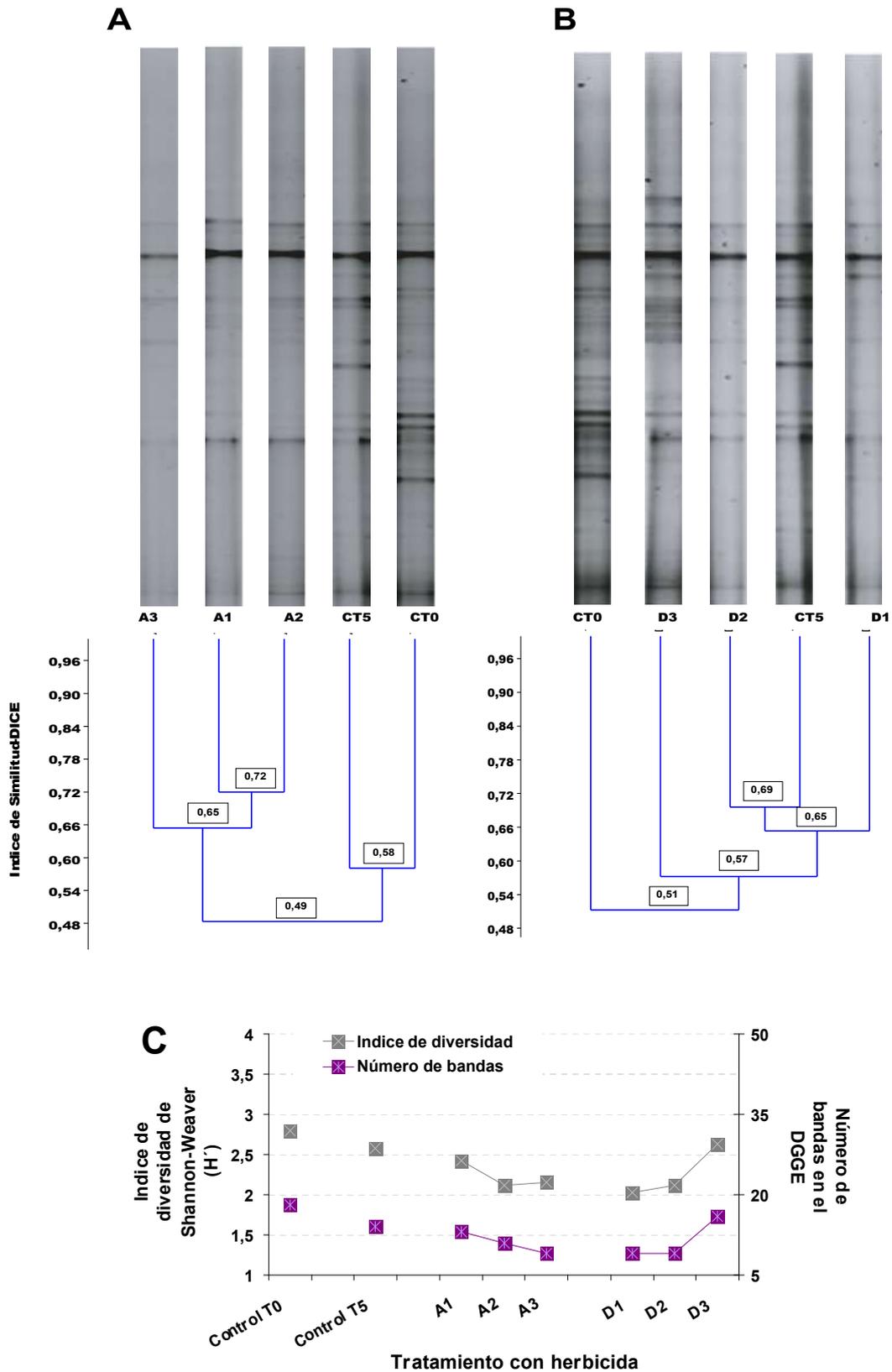


Figura 4-7. Análisis de los perfiles de DGGE de las muestras de primavera para las muestras tratadas con atrazina (A) y con 2,4-D (B). En (C) se presenta el número de bandas en el DGGE y el valor del índice de diversidad de Shannon-Weaver (H') para el control y las muestras tratadas. Control a T₅ equivale a Control T₁₂₀

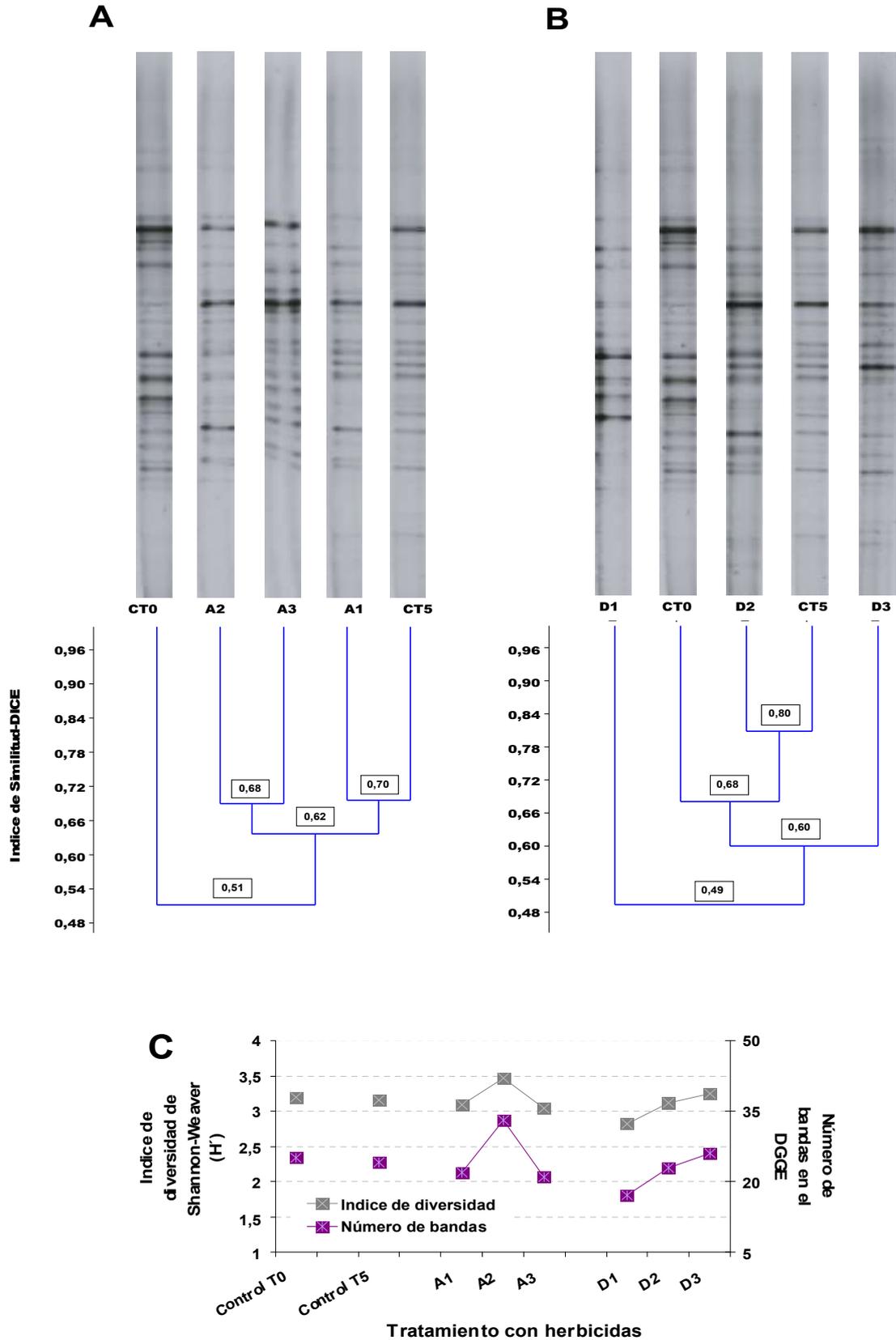


Figura 4-8. Análisis de los perfiles de DGGE de las muestras de otoño para las muestras tratadas con atrazina (A) y con 2,4-D (B). En (C) se presenta el número de bandas en el DGGE y el valor del índice de diversidad de Shannon-Weaver (H') para el control y las muestras tratadas. Control a T₅ equivale a Control T₁₂₀

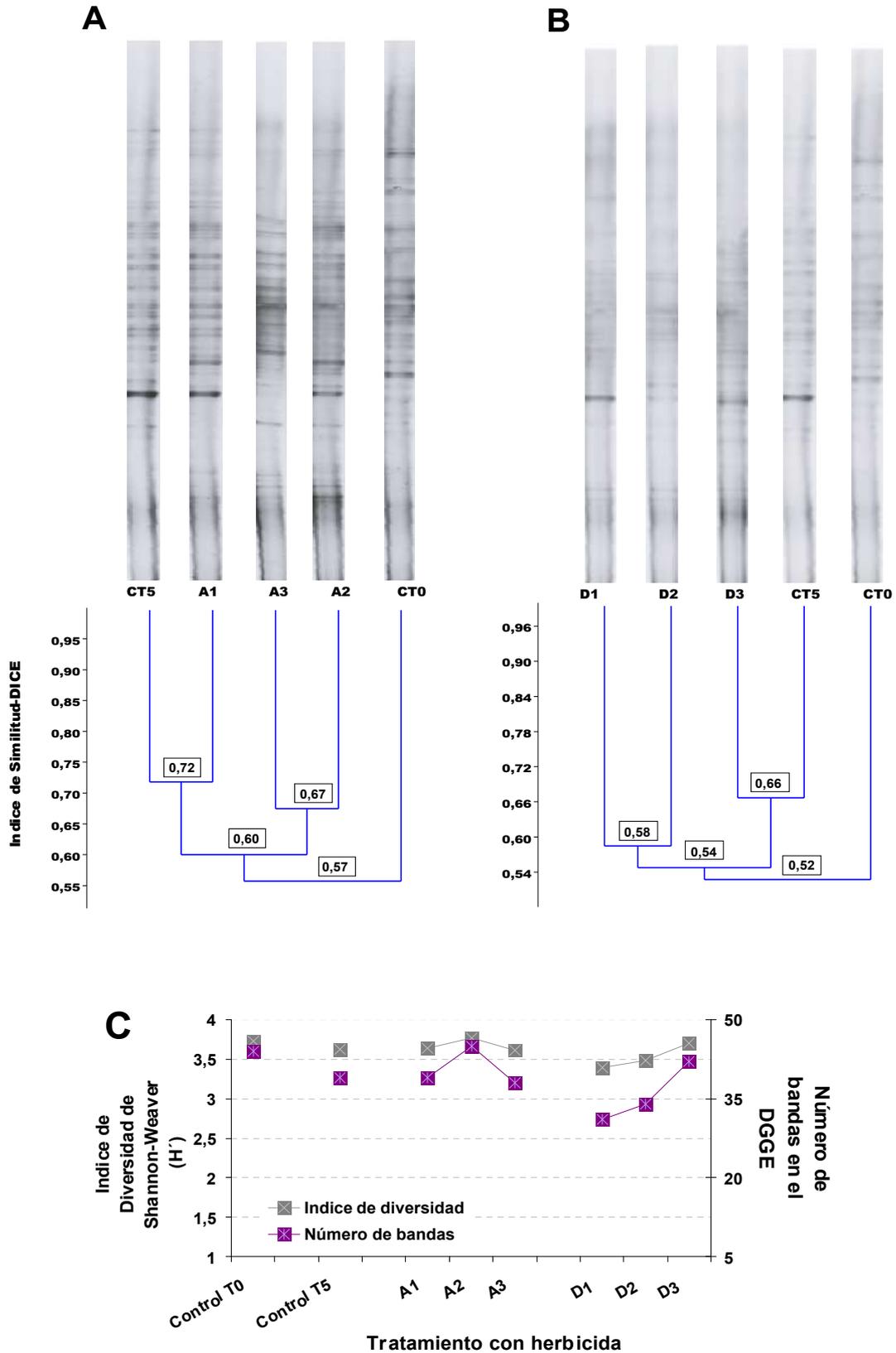


Figura 4-9. Análisis de los perfiles de DGGE de las muestras de invierno para las muestras tratadas con atrazina (A) y con 2,4-D (B). En (C) se presenta el número de bandas en el DGGE y el valor del índice de diversidad de Shannon-Weaver (H') para el control y las muestras tratadas. Control a T₅ equivale a Control T₁₂₀

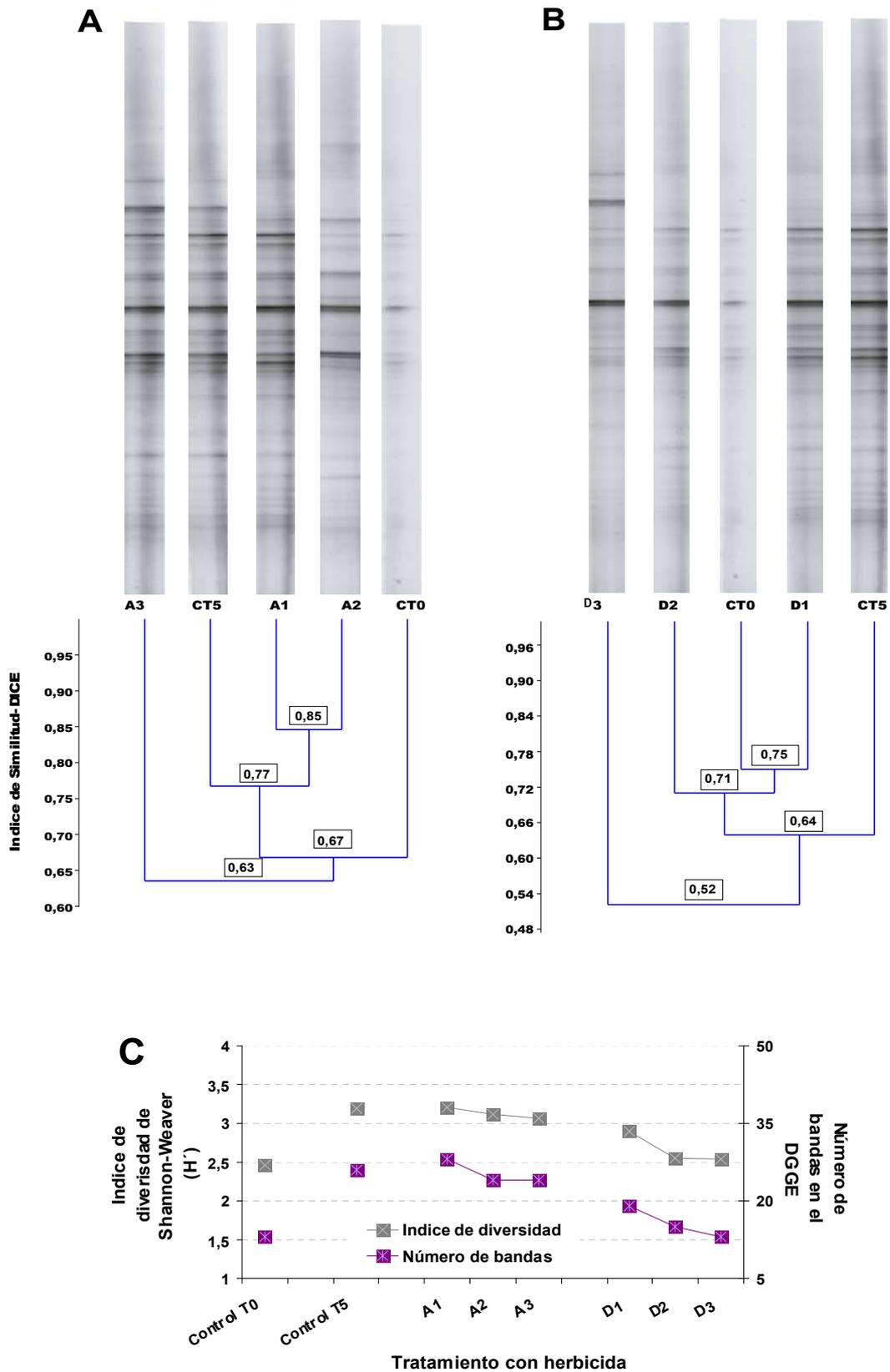


Figura 4-10. Análisis de los perfiles de DGGE de las muestras de primavera para las muestras tratadas con atrazina (A) y con 2,4-D (B). En (C) se presenta el número de bandas en el DGGE y el valor del índice de diversidad de Shannon-Weaver (H') para el control y las muestras tratadas. Control a T₅ equivale a Control T₁₂₀

En la Figura 4-7 se muestra el dendrograma construido con las muestras del ensayo de tolerancia correspondiente a verano. La mayor similitud se halló en el patrón de bandas de las muestras A1 y A2 (72%), las cuales a su vez comparten un 65% con la muestra A3. Por otro lado, se halló otro agrupamiento entre los controles a T_0 y T_{120} que presentan una similitud de bandas de 58%. Entre las muestras expuestas a atrazina y los controles se obtuvo una coincidencia de un 49% en el patrón de bandas (Figura 4-7.A). Las muestras D1 y D2 junto con el control a T_{120} mostraron los valores más altos de similitud (65%), mientras que D3 se separa de D1 y D2 con una similitud de bandas baja del 57%. Finalmente el control a T_0 mostró una coincidencia de bandas de tan sólo un 50% con los restantes grupos (Figura 4-7.B).

En relación con el número de bandas detectadas en las muestras de los ensayos correspondientes a verano fue mayor en los controles, disminuyendo de 18 bandas presentes en T_0 hasta 14 en T_{120} . Las muestras que recibieron concentraciones crecientes de atrazina mostraron un número decreciente de bandas desde 13 en la muestra A1 hasta 9 bandas en la muestra A3. Tanto en las muestras D1 como D2 se observaron 9 bandas, mientras que la muestra D3 se detectaron 16 bandas, un incremento incluso mayor respecto al control a T_{120} . Como puede observarse en la Figura 4-7.C, el número de bandas presenta el mismo perfil que los índices de diversidad genética expresadas como valor del Índice de Shannon-Weaver. El valor más alto del índice de diversidad se obtuvo en el control a T_0 ($H' = 2,80$), seguidos por el control a T_{120} ($H' = 2,57$), luego A1 ($H' = 2,42$), y finalmente las muestras A2 y A3 con valores de índice de diversidad $H' = 2,11$ y $2,15$, respectivamente. Los valores obtenidos del índice de diversidad para D1, D2 y D3 fueron $H' = 2,03$; $2,11$ y $2,62$ respectivamente.

En la Figura 4-8 se presenta el análisis del ensayo de tolerancia de las muestras extraídas en otoño. El patrón de bandas de la muestra A1 y el control a T_{120} mostró un índice de similitud de bandas de 70%. Por otro lado las muestras A2 y A3 comparten el 68% de bandas, y 62% con el agrupamiento A1-control a T_{120} . El control a T_0 se separa del agrupamiento anterior con el menor valor de coincidencia de bandas (51%) (Figura 4-8.A). Las muestras D2 y el control T_{120} presentaron una alta similitud de bandas (80%). A su vez, este agrupamiento comparte el 68% de similitud con el control a T_0 . Estos tres grupos comparten alrededor de 60% del patrón de bandas con D3, y finalmente la muestra D1 es la que presenta mayor variación respecto a los demás con una bajo índice de similitud en el patrón de bandas (49%) (Figura 4-8.B).

Del análisis del número de bandas y el índice de diversidad de Shannon se observó que prácticamente no se hallaron diferencias entre el control a T_0 y a T_{120} , siendo el número de bandas de 25 y 24 respectivamente y siendo similares los valores del índice de Shannon (H') de 3,19 para control a T_0 y 3,15 para control a T_{120} . Pequeñas diferencias también se hallaron entre las muestras A1 y A3 tanto en el número de bandas (A1= 22 y A3= 21) como del índice de Shannon (H' = 3,08 y 3,04 respectivamente), aunque estos valores fueron menores comparados con el control a T_{120} . Sin embargo los valores registrados para la muestra A2 fueron mayores tanto en número de bandas (33) como de diversidad de Shannon (H' = 3,46) comparado con el control a T_{120} . Por otro lado, la muestra D1 mostró un menor número de bandas (17) y el menor valor de diversidad de Shannon (H' = 2,82) respecto al control y las restantes muestras tratadas. A medida que se incrementó la concentración de 2,4-D aumentó tanto el número de bandas como el valor de diversidad de Shannon, (D2= 23 bandas; H' 3,11 y D3= 26 bandas, H' 3,24) incluso con valores levemente superiores al control a T_{120} (Figura 4-8.C).

En el ensayo de tolerancia realizado con las muestras provenientes de la estación de invierno (Figura 4-9) los perfiles de DGGE de las muestras que fueron expuestas a atrazina revelaron dos agrupamientos de la misma manera que las muestras del ensayo correspondiente a otoño. Por un lado, el grupo control a T_{120} y A1 que mostraron un coeficiente de similitud de bandas de 72%, y por el otro lado, A2 y A3 que comparten un 67% de similitud de bandas. Ambos subgrupos a su vez, presentaron una moderada similitud global del 60%, y finalmente el perfil del control a T_0 mostró una mayor variación en la posición de las bandas con un bajo valor de similitud (57%) (Figura 4-9.A).

Del análisis de las muestras que fueron tratadas con 2,4-D se observan también dos agrupamientos, en uno se reúnen el control a T_{120} y D3, los cuales mostraron el mayor índice de similitud en el patrón de los perfiles de bandas (66%), y en el segundo grupo se hallaron D1 y D2 los cuales comparten un 58% de las bandas detectadas. Ambos subgrupos presentaron una similitud de bandas global del 54%. Tal como en los casos anteriores, el control a T_0 sólo comparte cerca del 50% de las bandas detectadas. Al observar los perfiles de DGGE se pudo comprobar que hubo una gran variabilidad entre los distintos perfiles y esto podría deberse al mayor número de bandas identificadas comparado con los perfiles de DGGE de las otras estaciones del año (Figura 4-9.B). La muestra D1 mostró el menor número de bandas (31), mientras que la muestra A2 mostró el mayor número (45). Aquí nuevamente se detectó una pequeña disminución de la diversidad junto con el número de bandas entre los controles, siendo mas diverso el

control a T_0 (44 bandas y $H' = 3,73$) que el control a T_{120} (39 bandas y $H' = 3,63$). Además, la muestra A2 presentó el mayor índice de diversidad ($H' = 3,77$), mientras que la muestra A3 exhibió el valor más bajo de diversidad ($H' = 3,60$). Por otro lado tanto la muestra A1 como el control a T_{120} mostraron el mismo valor del índice de diversidad ($H' = 3,63$).

En el ensayo de tolerancia correspondiente a invierno, al igual que el de verano y el de otoño, los índices de diversidad aumentaron a medida que se incrementó la concentración de 2,4-D. De esta manera, la diversidad genética en los grupos D1, D2 y D3 fue $H' = 3,39$, $3,48$ y $3,69$ respectivamente (Figura 4-9.B).

En la Figura 4-10 se presentan los perfiles de DGGE de las muestras correspondientes al monitoreo de primavera. En el dendrograma construido con las muestras tratadas con atrazina, se observó que las muestras A1 y A2 presentan una alta similitud en sus patrones de bandas (85%), las cuales a su vez comparten un 77% de similitud con el control a T_{120} y un 67% con el control a T_0 . La muestra con mayores diferencias en el perfil de bandas fue A3 con un valor moderado de similitud de 63% (Figura 4-10.A). En la Figura 4-10.B se observó que la mayor similitud en los patrones de bandas de los DGGE se halló entre los grupos control a T_0 , D1 y D2 con un valor global de 71%. El grupo que mostró un bajo nivel de apareamiento de bandas fue D3 con solo un 52% de similitud.

De la comparación de los índices de riqueza y de diversidad de Shannon-Weaver surge que entre el control a T_0 y el control a T_{120} se produjo un incremento de ambos índices (Figura 4-10.C). De manera que al aumentar el número detectado de bandas de 13 a 26, aumentó el valor del índice de diversidad de 2,45 a 3,19 en el control a T_0 y el control a T_{120} respectivamente. Tanto las muestras que fueron expuestas a atrazina como a 2,4-D mostraron una disminución de los valores de diversidad a medida que se incrementó la concentración de los compuestos. Es así que los valores del índice de diversidad obtenidos para las muestras A1, A2 y A3 fueron $H' = 3,21$, $3,11$ y $3,07$; y para las muestras D1, D2 y D3 fueron $H' = 2,89$, $2,55$ y $2,54$ respectivamente. Respecto al número de bandas, también se obtuvo una pequeña disminución a medida que se incrementó la concentración de los compuestos. Se obtuvieron 28 bandas en la muestra A1 y 24 en la muestra A3; mientras que en la muestra D1 presentó 19 bandas y la muestra D3 éste número fue de 13. Sin embargo se puede comprobar una alta homogeneidad entre los distintos perfiles del DGGE.

4.3 Evaluación de la función metabólica de la comunidad bacteriana

4.3.1 Perfil fisiológico de la comunidad bacteriana

Al finalizar los ensayos de tolerancia a atrazina y 2,4-D (T_{120}) se tomaron alícuotas con el fin de evaluar los cambios en el perfil fisiológico de las comunidades bacterianas adaptadas a la presencia de los herbicidas. Para ello se evaluaron los perfiles de consumo de 30 fuentes de carbono, tanto de los controles como de las muestras tratadas con las tres concentraciones de atrazina y de 2,4-D correspondiente a los ensayos con las muestras de verano (Figura 4-11.A-B), de otoño (Figura 4-12.A-B), de invierno (Figura 4-13.A-B) y de primavera (Figura 4-14.A-B). El consumo se expresó a partir de los valores de absorbancia neta tal como fue descrito en Materiales y Métodos.

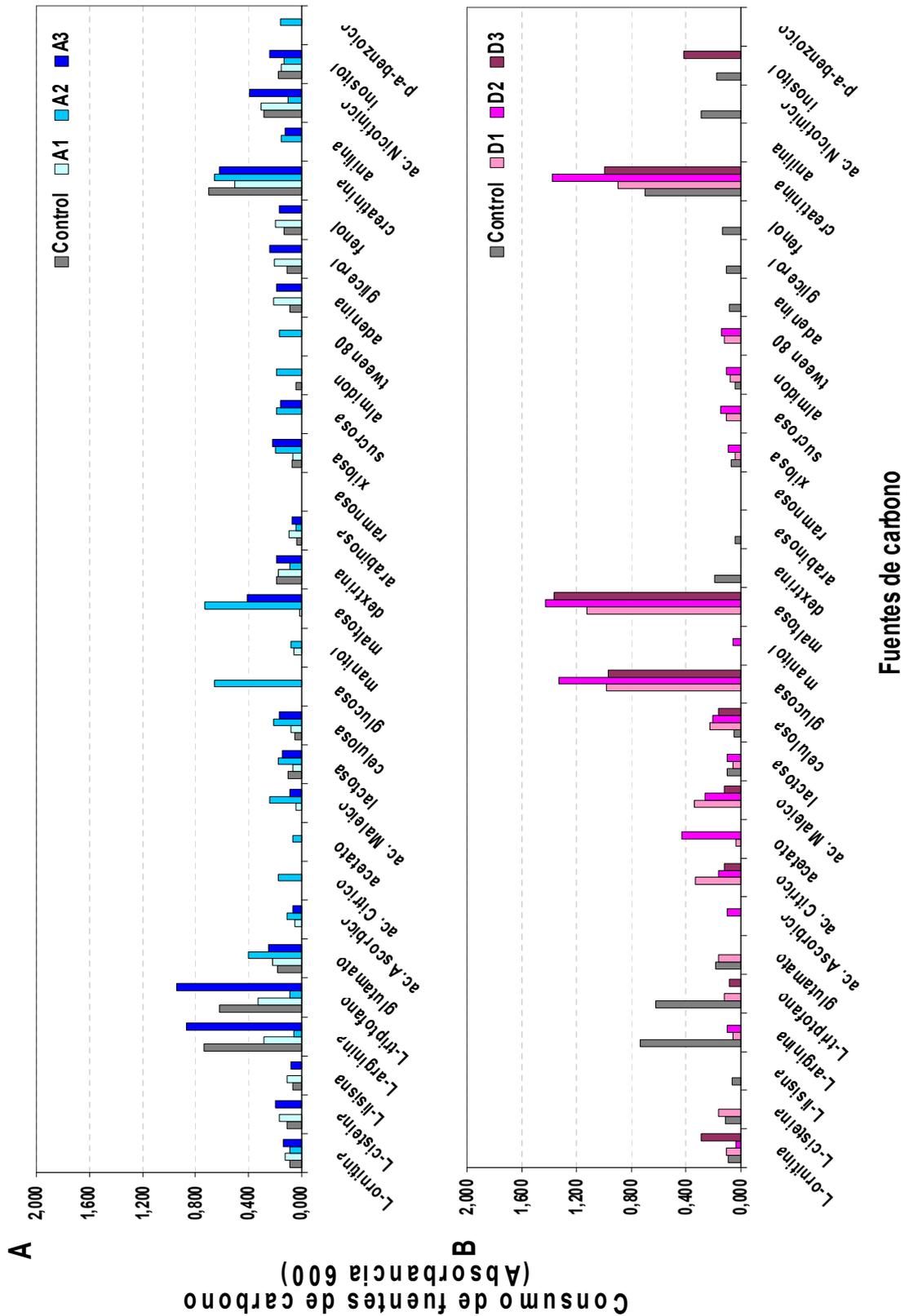


Figura 4-12. Perfiles de consumo de las 30 fuentes de carbono de las muestras del ensayo de tolerancia de otoño. Se comparan las absorbancias de las muestras tratadas con atrazina (A1= 0,02 mg/L; A2= 0,20 mg/L y A3= 2 mg/L) respecto al control a T₁₂₀ (Gráfico A), y de las muestras tratadas con 2,4-D (D1= 2 mg/L; D2= 20 mg/L y D3= 200 mg/L) respecto al control a T₁₂₀ (Gráfico A).

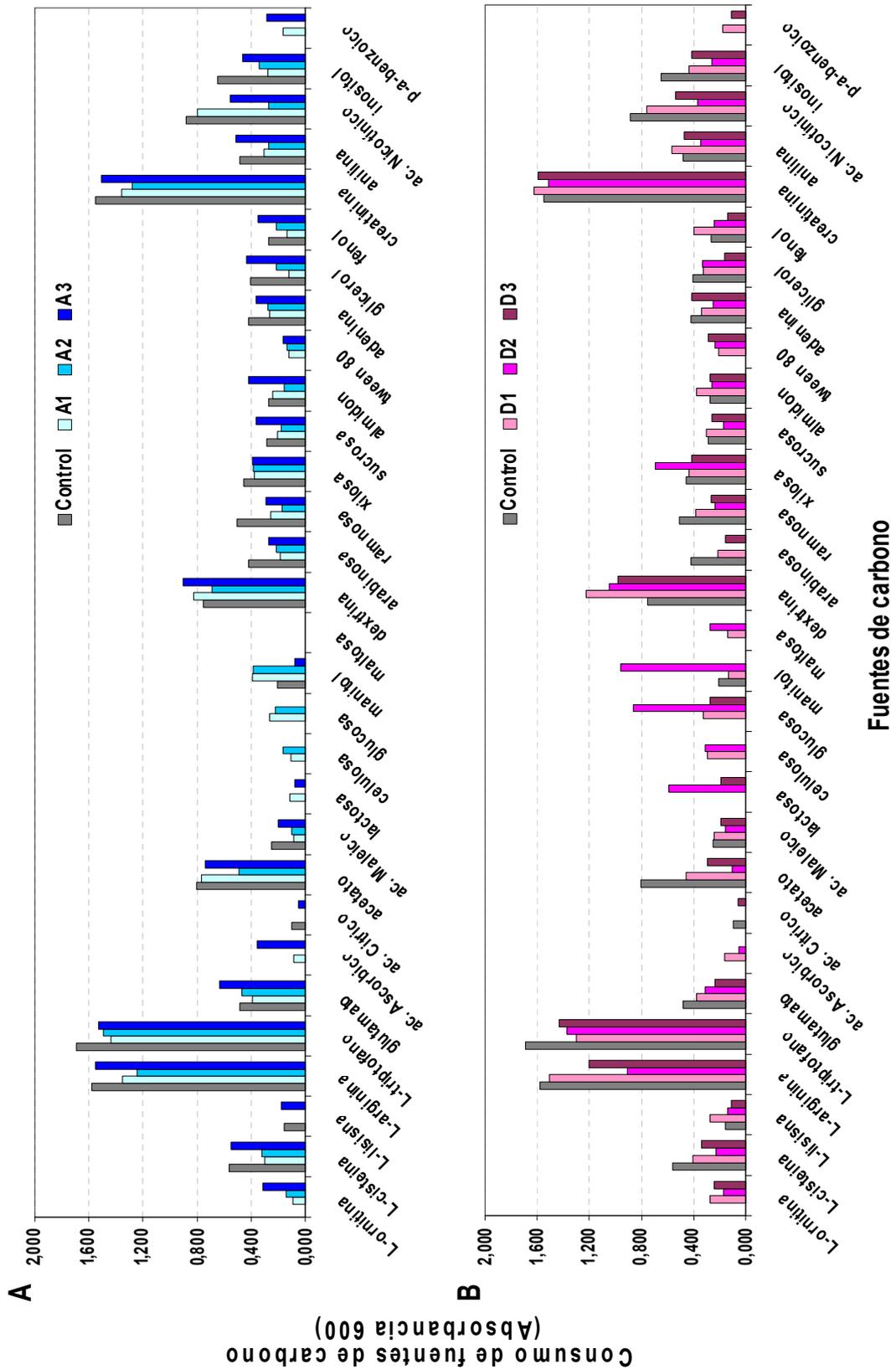


Figura 4-14. Perfiles de consumo de las 30 fuentes de carbono de las muestras del ensayo de tolerancia de primavera. Se comparan las absorbancias de las muestras tratadas con atrazina (A1= 0,02 mg/L; A2= 0,20 mg/L y A3= 2 mg/L) respecto al control a T₁₂₀ (Gráfico A), y de las muestras tratadas con 2,4-D (D1= 2 mg/L; D2= 20 mg/L y D3= 200 mg/L) respecto al control a T₁₂₀ (Gráfico A).

A partir de los perfiles de utilización de fuentes de carbono presentados en las Figuras 4-11 a 4-14 se puede destacar una mayor diversidad de sustratos consumidos y con mayor intensidad en las muestras provenientes de los monitoreos de verano y de primavera. Por el contrario, en las muestras correspondientes a otoño e invierno se observó una baja diversidad de sustratos con menores intensidades de consumo.

Los sustratos consumidos con mayor preferencia en las cuatro estaciones fueron los aminoácidos, en particular L-arginina y L-triptófano. Con una menor intensidad se destaca el consumo del ácido nicotínico y la creatinina.

Los datos de consumo de cada microplaca fueron utilizados para calcular la Respuesta Metabólica Promedio (RMP) y la Diversidad Metabólica de la Comunidad (DMC). En la Figura 4-15 se presentan los valores promedio expresados como RMP y DMC de las muestras que fueron expuestas a las tres concentraciones de atrazina y de 2,4-D correspondientes a los ensayos de verano (Figura 4-15.A), otoño (Figura 4-15.B), invierno (Figura 4-15.C) y primavera (Figura 4-15.D).

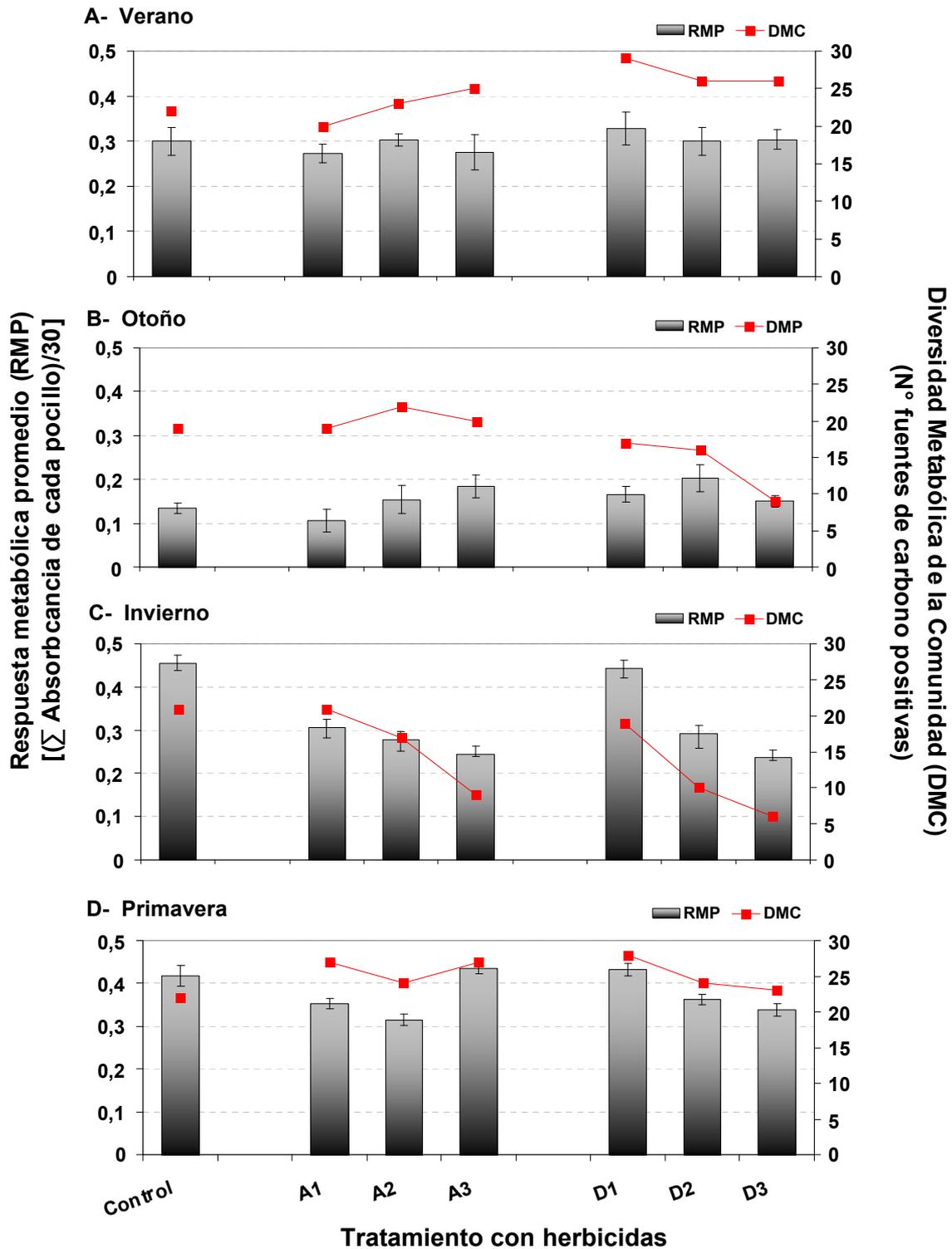


Figura 4-15. Respuesta Metabólica Promedio (RMP) (Barras) y Diversidad Metabólica de la Comunidad (DMC) (-■-) de las muestras tratadas con diferentes concentraciones de atrazina (A1, A2 y A3) y de 2,4-D (D1, D2 y D3) extraídas en los ensayos de tolerancia a T₁₂₀ en A) Verano, B) Otoño, C) Invierno y D) Primavera. Los resultados corresponden al día de 10 de incubación de las microplacas. Las barras de error representan los desvíos estándar (n=3).

Del consumo de sustratos expresado como el promedio RMP se obtuvieron diferentes rangos dependiendo de la estación del año considerando tanto el control como las muestras tratadas. El rango más bajo se halló para las muestras extraídas en otoño con valores que oscilaron entre 0,1 a 0,2 (expresado como valor promedio de las lecturas de absorbancia neta). Los valores más altos de RMP se determinaron en todas las muestras tratadas de los ensayos correspondientes a primavera, las cuales oscilaron entre 0,31 a 0,45. Tanto en las muestras extraídas en invierno como en verano se registraron valores de RMP intermedios entre 0,23-0,44 (Figura 4-15).

Si bien las muestras tratadas con atrazina mostraron mucha dispersión de valores de RMP respecto a cada control en cada ensayo de tolerancia, se halló que las muestras tratadas con 2,4-D los valores de RMP disminuyeron a medida que se incrementó la concentración de 2,4-D (Figura 4-15).

Las muestras extraídas en el ensayo de tolerancia de verano (Figura 4-15.A) expuestas a atrazina y a 2,4-D no mostraron diferencias significativas (ANOVA, $P=0,187$) entre los valores de RMP respecto al control. El número total de fuentes de carbono consumidas expresado como DMC fue mayor en A2, A3 y en las tres muestras expuestas a 2,4-D en relación con el control. Además, el número de sustratos empleados aumentó en las muestras expuestas a atrazina respecto al control aumentando desde 21 (control y A1), a 25 en la muestra A3. En las muestras expuestas a 2,4-D se consumieron 29 sustratos en el grupo D1 y 26 en D2 y D3.

En las muestras extraídas en el ensayo de otoño (Figura 4-15.B) se observó que los valores promedios de RMP en las muestras A1 y A2 mostraron valores similares al control (RMP control= 0,134, A1= 0,106 A2=0,153), obteniendo el valor promedio de RMP más elevado en la muestra A3 (0,183). En cuanto al número de fuentes consumidas, el control utilizó 18 sustratos, mientras que las muestras A1, A2 y A3 utilizaron 21, 24 y 22 respectivamente. Las muestras tratadas con 2,4-D presentaron valores promedios de RMP significativamente superiores respecto al control (D1= 0,165, D2= 0,202 y D3=0,150; ANOVA, $P<0,001$). En relación con el número de sustratos utilizados las muestras expuestas a 2,4-D fueron menores comparados con el control. Las fuentes de carbono utilizadas fueron 17, 16 y 9 en las muestras D1, D2 y D3 respectivamente.

En el ensayo correspondiente a invierno (Figura 4-15.C), las muestras tratadas con atrazina y con 2,4-D presentaron valores promedio de RMP y DMC más bajos comparados con el control (0,441 y 21 respectivamente). Además se observó que los valores disminuyeron a medida que se incrementó la concentración de atrazina y de 2,4-D. Los

valores promedio de RMP para las muestras expuestas a atrazina y a 2,4-D fueron: A1= 0,306, A2= 0,278, A3= 0,244, D1= 0,443, D2= 0,292 y D3= 0,236. Por otro lado los valores obtenidos de DMC para las muestras expuestas a atrazina y a 2,4-D fueron: A1= 21; A2= 17, A3= 9; D1= 19; D2= 10 y D3= 8. El análisis de ANOVA reveló que las diferencias entre las medias de los grupos resultaron ser significativas ($P < 0,05$) y el test *a posteriori* de Tukey, corroboró que las diferencias estadísticas se hallaron entre el control y cada muestra expuesta a atrazina, entre D2 y D3, y D1 versus D2 y D3 ($P < 0,001$).

En las muestras extraídas del ensayo de tolerancia de primavera (Figura 4-15.D), los valores promedio de RMP en el control (0,453) fueron mayores que los valores determinados para A1= 0,354 y A2= 0,314, mientras que A3 mostró valores similares al del control (0,435). El número de sustratos consumidos fue mayor en las muestras tratadas con atrazina (A1= 25, A2= 24 y A3= 27) comparados con el control (22). Las muestras que recibieron tratamiento con 2,4-D mostraron resultados similares a los obtenidos con atrazina con valores promedios menores de RMP respecto al control, aunque con mayor número de sustratos consumidos (D1= 0,433; 28; D2= 0,362, 27 y D3= 0,338, 26; valores de RMP y DMC respectivamente). Como resultado del análisis estadístico el test *a posteriori* de Tukey reveló que las diferencias se presentaron entre el control y la muestra A2 ($P = 0,02$).

Con el objetivo de evaluar los cambios obtenidos en la diversidad metabólica como respuesta a la exposición a los herbicidas se presentan en la Figura 4-16 los resultados del cálculo de los índices de Diversidad de Shannon-Weaver (H') (Figura 4-16.A), de Equitatividad (E') (Figura 4-16.B), de Dominancia (Figura 4-16.C) y de Similitud de DICE-Sørensen (S') (Figura 4-16.D) a partir de los resultados del consumo de las fuentes de carbono presentados en las Figuras 4-11 a 4-14. En cada Figura se presentan los resultados de los ensayos de tolerancia correspondientes a las estaciones de verano, otoño, invierno y primavera.

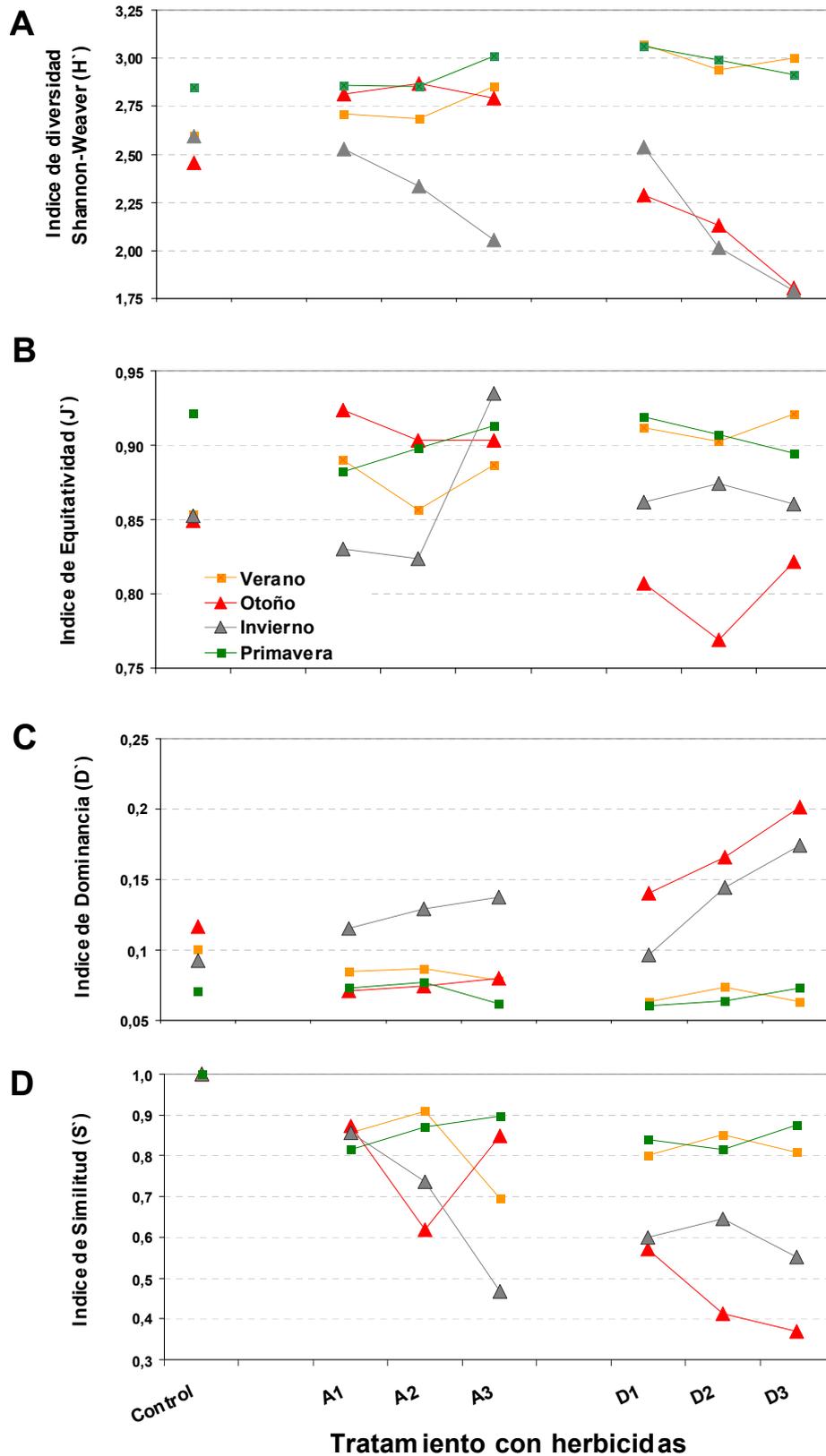


Figura 4-16. (A) Índice de diversidad de Shannon (H'), (B) índice de Equitatividad (J'), (C) Dominancia (D') y similitud de DICE-Sørensen (S') (D). Se presentan los resultados a T_{120} de los ensayos de tolerancia correspondientes a Verano (-■-), Otoño (-▲-), Invierno (-▲-) y Primavera (-■-) para las muestras tratadas con atrazina: A1) 0,02 mg/L; A2) 0,2 mg/L y A3) 2 mg/L y con 2,4-D: D1) 2 mg/L, D2) 20 mg/L y D3) 200 mg/L respecto al control a T_{120}

En la Figura 4-16.A se presentan los resultados obtenidos para el índice de diversidad de Shannon-Weaver, donde se puede comprobar que los valores más altos se hallaron en las muestras extraídas en primavera con un rango de valores ($H' = 2,85 - 3,06$) mientras que los valores más bajos se obtuvieron en las muestras correspondientes a invierno ($H' = 1,79 - 2,60$). Además, en los ensayos correspondientes a primavera y verano las muestras A1 y A2 mostraron los mismos valores del índice de Shannon-Weaver, siendo el valor para verano de $H' = 2,7$ y para el de primavera $H' = 2,86$. En ambas estaciones la muestra A3 incrementó la diversidad metabólica en un 9,8% en verano y 5,5% en primavera respecto a cada control. En el ensayo correspondiente a verano y a primavera las muestras D1 mostraron valores de H' de 3,07 y de 3,06 respectivamente. Las muestras D2 y D3 en ambas estaciones presentaron valores levemente inferiores a D1

En el ensayo correspondiente a otoño las muestras expuestas a atrazina, presentaron valores entre 13 y 16% más altos de diversidad metabólica respecto al control ($H' = 2,46$). En el ensayo con las muestras de invierno los valores del índice de Shannon disminuyeron al incrementar la concentración de atrazina, llegando a valores de 2,05 en la muestra A3 respecto al control ($H' = 2,60$). Los grupos que recibieron los tratamientos con 2,4-D, tanto en las muestras extraídas en otoño como en invierno, los valores de diversidad metabólica disminuyeron a medida que se incrementó la concentración del compuesto, hasta valores de 1,8 en las muestras D3 de ambas estaciones del año.

El índice de Equitatividad (Figura 4-16.B), representa cuán homogénea es la intensidad de consumo de los sustratos. Valores cercanos a 1 indican una alta homogeneidad. Para las muestras extraídas de los ensayos de tolerancia correspondientes a verano y primavera las comunidades bacterianas que recibieron el tratamiento con herbicida consumieron los sustratos con un intensidad relativamente similar con valores de Equitatividad que variaron (J') entre 0,85 a 0,92. En las muestras extraídas del ensayo de otoño e invierno, si bien presentaron el mismo valor ($J' = 0,85$), se observaron perfiles de Equitatividad más erráticos para los grupos tratados con ambos herbicidas. Mientras que en las muestras extraídas en otoño y expuestas a diferentes concentraciones de atrazina mostraron una alta homogeneidad en el consumo de los sustratos, los valores de los índices de Equitatividad obtenidos en las muestras que recibieron diferentes concentraciones de 2,4-D fueron menores comparados con el control, siendo la muestra D2 la que mostró una gran selectividad en el consumo de

sustratos ($J' = 0,77$), es decir, del total del número de fuentes de carbono utilizadas, sólo algunas de ellas fueron consumidas con mayor intensidad.

El índice de Dominancia (Figura 4-16.C) determinado en las muestras de los ensayos correspondientes a verano y primavera mostraron una alta heterogeneidad en la utilización de los sustratos para todas las muestras tratadas con herbicidas. Por el contrario, en los ensayos correspondientes a otoño e invierno los valores de dominancia fueron más altos en las muestras que recibieron tratamiento con atrazina y con 2,4-D (excepto para los grupos que recibieron atrazina en el ensayo de invierno) respecto al control. Altos valores de dominancia implican que uno o unos pocos sustratos son consumidos con mayor preferencia.

En la Figura 4-16.D se presentan los índices de similitud de DICE-Sørensen. En todas las muestras A1 y A2 extraídas en los ensayos de tolerancia correspondientes a las distintas estaciones del año los valores de Similitud (expresados como porcentajes respecto a cada control) fueron superiores al 82%. Solo en la muestra A2 del ensayo correspondiente a invierno este porcentaje de similitud disminuyó a 74%. La muestra A3 presentó valores más dispares, hallando en los ensayos correspondientes a otoño y primavera, porcentajes de similitud respecto al control de 85 y 90% respectivamente, mientras que en las muestras correspondientes a verano e invierno los porcentajes fueron menores: 70 y 47% respectivamente.

Las muestras que fueron expuestas a las tres concentraciones de 2,4-D mostraron dos grupos diferentes dependiendo de las estaciones del año. Por un lado, en las muestras D1, D2 y D3 que fueron extraídas en los ensayos de tolerancia correspondientes a verano y a primavera se obtuvieron valores de similitud altos dentro del rango 80 a 88%. Contrariamente, en las muestras extraídas en los ensayos de tolerancia correspondientes a otoño y a invierno se comprobó que la similitud respecto al control disminuyó progresivamente a medida que se incrementó la concentración de 2,4-D. En las muestras correspondientes a otoño los valores del índice de similitud se hallaron en 57, 41 y 37% para D1, D2 y D3 respectivamente. En las muestras correspondientes a invierno los porcentajes fueron 60, 65 y 55% para D1, D2 y D3 respectivamente.

Posteriormente se analizó el consumo de las fuentes de carbono en función del tipo de sustrato. De esta manera los sustratos se reagruparon en aminoácidos (AA), ácidos orgánicos (AO), carbohidratos (CH), polímeros y compuestos aromáticos (PyA), y vitaminas (V). Los valores de **Consumo relativo de fuentes de carbono por tipo de**

sustrato se presentaron como proporciones relativas respecto al consumo total. En la Figura 4-17 se presentan los resultados de los ensayos de tolerancia a T₁₂₀ correspondientes a verano (Figura 4-17.A), otoño (Figura 4-17.B), invierno (Figura 4-17.C) y primavera (Figura 4-17.D).

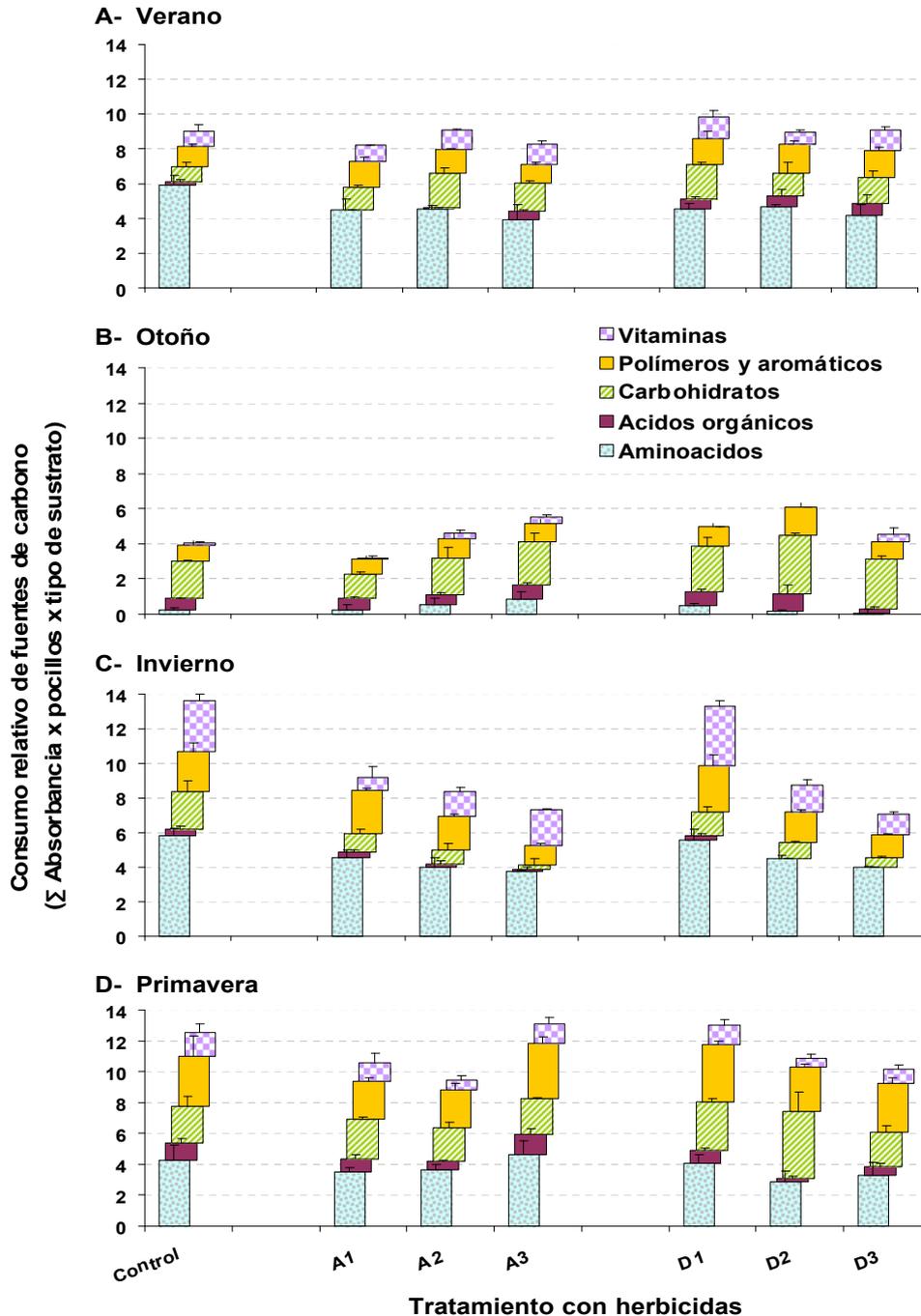


Figura 4-17. **Consumo relativo por tipo de sustrato** respecto al consumo total de fuentes de carbono de las muestras del ensayo de tolerancia de A) Verano, B) Otoño, C) Invierno y D) Primavera. Se comparan los resultados de las muestras expuestas a atrazina (A1= 0,02 mg/L; A2= 0,20 mg/L y A3= 2 mg/L) y a 2,4-D (D1= 2 mg/L; D2= 20 mg/L y D3= 200 mg/L) respecto al control a T₁₂₀. Las barras de error representan los desvíos estándar dentro de cada agrupamiento por tipo de sustrato.

En la Figura 4-17 se puede apreciar cuales son los tipos de sustratos que fueron utilizados por las diferentes comunidades bacterianas presentes en las muestras de los ensayos de tolerancia a los herbicidas. A lo largo del año, las muestras control utilizaron diferentes tipos de sustratos y en diferentes proporciones.

En las muestras provenientes de la estación de verano (Figura 4-17.A) la previa exposición a atrazina y a 2,4-D se manifestó como una menor proporción de consumo de aminoácidos respecto al control. En todas las muestras tratadas con atrazina y con 2,4-D mostraron un incremento en el consumo de ácidos orgánicos, vitaminas y carbohidratos respecto al control.

En el ensayo de tolerancia realizado con las muestras de otoño se registraron los menores consumos de sustratos y los valores mas bajos de diversidad metabólica, y esto puede deberse a que la proporción de aminoácidos consumidos es muy baja (Figura 4-17.B). Se destaca que en las comunidades bacterianas que fueron expuestas a las concentraciones más altas de herbicidas (como A3, D2 y D3) se detectaron mayores consumos de vitaminas comparado con los controles. Al comparar las muestras que recibieron tratamiento con atrazina y con 2,4-D los perfiles de consumo fueron distintos, destacando que las poblaciones bacterianas responden de manera diferente dependiendo del tipo de herbicida.

En el ensayo de tolerancia correspondiente a invierno (Figura 4-17.C) se observó que el control mostró un mayor consumo de todos los tipos de sustratos. Al comparar el control con las muestras tratadas se observaron menores proporciones de consumo de los distintos tipos de sustratos. Estas diferencias también pueden estar asociadas al menor número de sustratos empleados por las comunidades bacterianas presentes en las muestras tratadas tal como se evidencia en la Figura 4-15.

En la Figura 4-17.D se presentan los resultados del ensayo de tolerancia correspondiente a primavera. Si bien no se observó que hubiese un patrón muy marcado en cuando a la preferencia por un determinado tipo de sustrato, sí se observó que disminuyó el consumo de aminoácidos y vitaminas en las muestras A1 y A2. En la muestra A3 se registraron proporciones de consumos similares aunque levemente superiores comparados con el control. Mientras que la muestra D1 presentó un perfil muy similar al del control, la muestra D2 mostró un mayor consumo de carbohidratos y menor consumo de ácidos orgánicos. En la muestra D3 se obtuvieron menores proporciones de consumo en todos los agrupamientos por tipo de sustratos.

4.3.2 Evaluación del consumo de fuentes de carbono mediante Análisis de Componentes Principales

Para comparar las similitudes entre los perfiles de consumo de fuentes de carbono a lo largo del tiempo, se aplicó el método de Análisis de Componentes Principales (PCA). De esta manera se puede visualizar el espacio multidimensional considerando las N dimensiones generadas por las fuentes de carbono. Mediante la aplicación de PCA se sintetizó en los componentes principales la combinación del subconjunto de variables independientes (fuentes de carbono) en las que se concentró la mayor varianza.

Se evaluaron los cambios en los consumos de sustratos asociados a la estación del año considerando los diferentes agrupamientos por tipos de fuentes de carbono: aminoácidos (AA) (Figura 4-18), ácidos orgánicos (AO) (Figura 4-19), carbohidratos (CH) (Figura 4-20), polímeros y compuestos aromáticos (PyA) (Figura 4-21), y vitaminas (V) (Figura 4-22). Para el análisis de cada grupo se utilizaron tanto los controles como las muestras que recibieron tratamiento con atrazina y 2,4-D.

- AMINOACIDOS

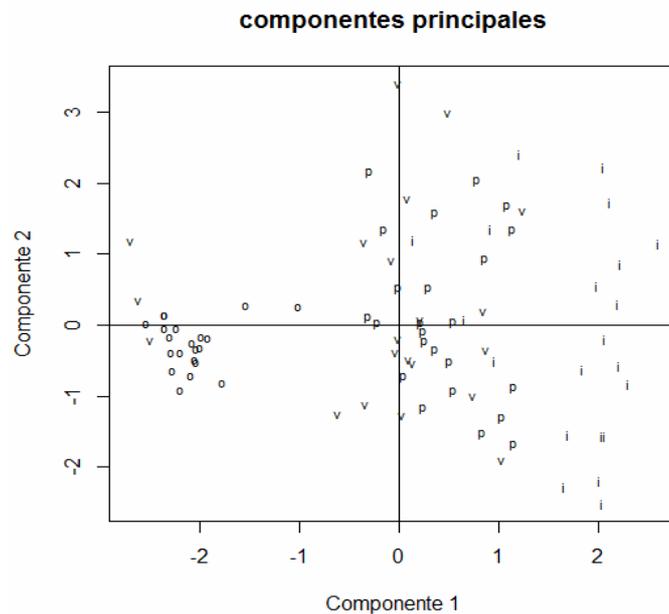


Figura 4-18. Análisis de Componentes Principales del consumo de aminoácidos. Se utilizan los resultados de verano (v), otoño (o), invierno (i) y primavera (p).

La componente 1 contrapone los valores de absorbancia de L-ornitina versus la absorbancia de L-cisteína, L-arginina y L-triptófano. Los datos de los ensayos correspondientes a invierno muestran una alta absorbancia de L-ornitina y los valores

más bajos de absorbancia en L-cisteína, L-arginina y L-triptófano, por eso aparecen con los más altos en la componente 1.

Los datos de los ensayos correspondientes a otoño, por el contrario, tienen los valores más bajos de absorbancia de L-ornitina y los más altos para L-cisteína, L-arginina y L-triptófano, por eso tienen los valores más negativos en la componente 1. Se destaca que en estos ensayos el consumo de estos sustratos es muy característico y forma un agrupamiento compacto y bien separado del resto de los datos.

En cuanto a los datos de los ensayos correspondientes a primavera-verano (período húmedo) dan valores de absorbancia parecidos tanto para L-ornitina como para L-cisteína, L-arginina y L-triptófano por eso ocupan la región media de la Figura 4-18 y aparecen formando una nube de datos dispersos.

- ACIDOS ORGANICOS

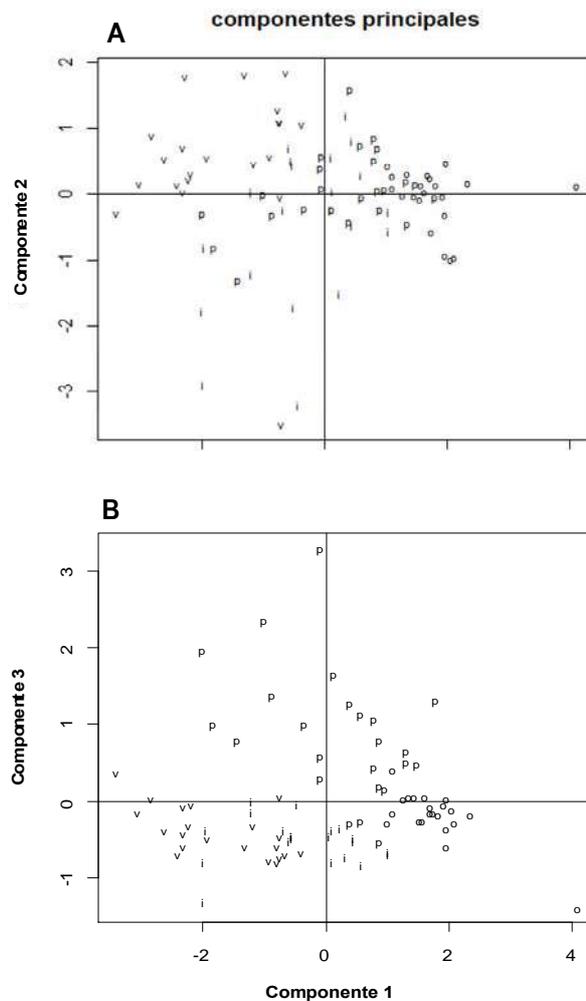


Figura 4-19. Análisis de Componentes Principales del consumo de ácidos orgánicos. Se utilizan los resultados de verano (v), otoño (o), invierno (i) y primavera (p). Gráfico A presenta la Componente 1 vs. Componente 2 y Grafico B presenta la Componente 1 vs. Componente 3.

Para el análisis de los ácidos orgánicos se utilizó la suma ponderada con ponderadores negativos de las absorbancias para describir la Componente 1. En la Figura 4-19.A se indica que la mayor absorbancia global de los ácidos orgánicos ocurre en verano, aunque una gran cantidad de observaciones de invierno muestran el mismo comportamiento global. Los datos del ensayo correspondientes a otoño aparecen dominando hacia valores altos de la Componente 1 aunque representan los valores con menor absorbancia global. En el caso de los datos correspondientes al ensayo de primavera se observa un comportamiento disperso equidistante del cero.

La Componente 2 compara los valores de absorbancia del ácido maleico versus las absorbancias del resto de los ácidos orgánicos. En el agrupamiento de verano se confirma este valor discriminativo del ácido maleico, con valores más altos de absorbancia diferencial respecto a los restantes ácidos orgánicos. Estos valores se observan en el eje de la componente 2 con valores positivos.

Por otro lado, las observaciones correspondientes a invierno se distribuyen en la Componente 2 respecto al cero hacia valores más altos y más bajos pero con valores negativos de mayor intensidad respecto a la Componente 1. Los datos tanto para primavera como para otoño se dispersan en torno a cero entre +1 y -1.

En la Figura 4-19.B se representan la Componente 3 versus Componente 1 donde se observa la separación de los valores de absorbancia del ácido ascórbico y el ácido cítrico en contraposición a las absorbancias del ácido acético. En esta Figura se muestra que los datos de los ensayos correspondientes a primavera dominan el ácido ascórbico y el ácido cítrico respecto al ácido acético. Esta relación se da moderadamente invertida para las otras tres estaciones del año.

- CARBOHIDRATOS

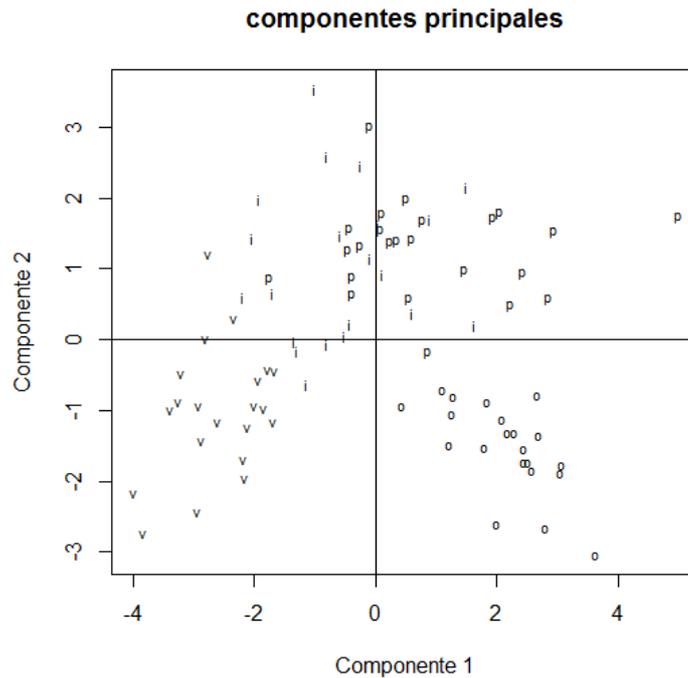


Figura 4-20. Análisis de Componentes Principales del consumo de carbohidratos. Se utilizan los resultados de verano (v), otoño (o), invierno (i) y primavera (p).

Al representar en el plano de la Componente 1 y la Componente 2 los datos de carbohidratos se hallaron agrupamientos bien definidos para cada estación del año, localizándose prácticamente en cuadrantes diferentes (Figura 4-20). En la Componente 1 se representa la suma ponderada con signo negativo de todas las absorbancias de carbohidratos. Así la mayor absorbancia global está contenida en los datos de verano los cuales se ubican en el tercer cuadrante (inferior izquierdo), mientras que los datos de invierno se distribuyen en el segundo cuadrante (superior izquierdo) con valores altos de absorbancia. Las estaciones de menor absorbancia global son otoño y primavera.

La componente 2 contrapone absorbancias de maltosa, celulosa, glucosa, lactosa y arabinosa (grupo A) respecto a las absorbancias de manitol, dextrina, ramnosa y xilosa (grupo B). Tanto en las muestras de la estación de primavera como de verano (I^o y II^o cuadrantes) presentan altas absorbancias del grupo A en relación al grupo B. Los datos de las muestras de los ensayos correspondientes a verano y otoño (III^o y IV^o cuadrantes) presentan bajas absorbancias del grupo A en relación al B.

- POLIMEROS Y COMPUESTOS AROMATICOS

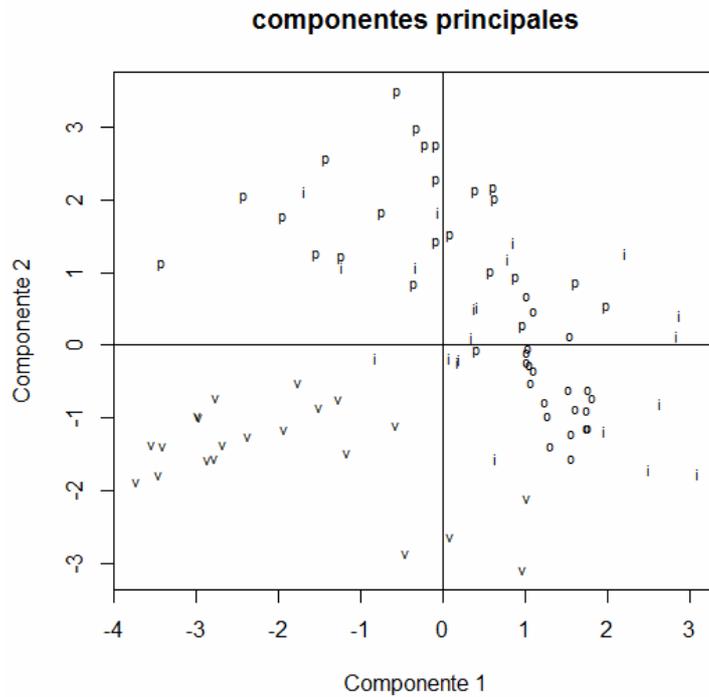


Figura 4-21. Análisis de Componentes Principales del consumo de polímeros y compuestos aromáticos. Se utilizan los resultados de verano (v), otoño (o), invierno (i) y primavera (p).

En la Figura 4-21 se presenta la distribución de datos de los polímeros y compuestos aromáticos. La Componente 1 compara valores de absorbancias de adenina, glicerol y fenol (grupo A), versus valores de absorbancias de almidón, tween 80, creatinina y anilina (grupo B). De esta manera los datos correspondientes a otoño muestran mayor absorbancia del grupo A que del B. En el caso de los datos de los ensayos correspondientes a verano sucede el comportamiento opuesto donde el grupo B es el que presenta mayores absorbancias. Por otro lado, los datos que corresponden a invierno y primavera se ven dispersos respecto al cero, es decir que los sustratos presentan valores intermedios y muy variables de absorbancias.

En la Componente 2 se representa los valores de absorbancia global con ponderación negativa. Respecto a ello, los valores de mayor absorbancia global correspondieron a los datos de los ensayos correspondientes a verano y otoño. Las

absorbancias globales correspondientes a primavera son bajas y se ubican en el I^o y II^o cuadrante

- VITAMINAS

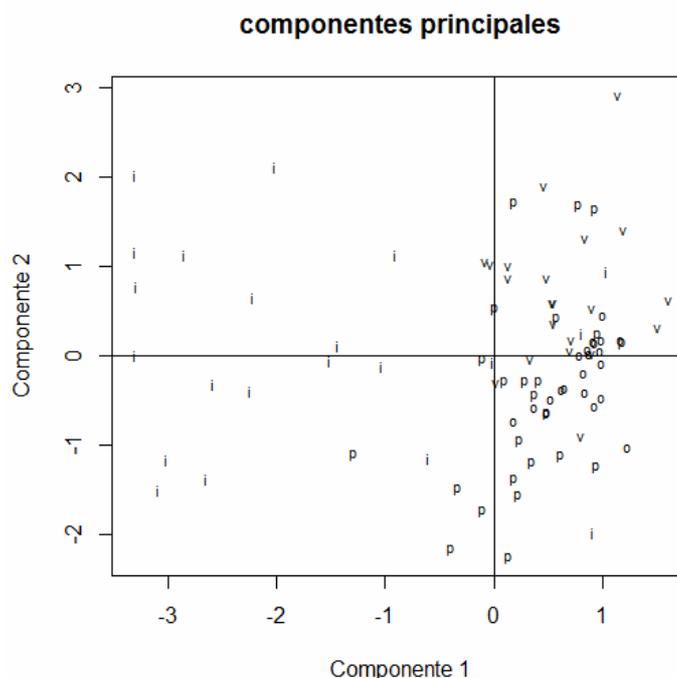


Figura 4-22. Análisis de Componentes Principales del consumo de vitaminas. Se utilizan los resultados de verano (v), otoño (o), invierno (i) y primavera (p).

El análisis del grupo de vitaminas se presenta en la Figura 4-22. La Componente 1 contrapone absorbancias de ácido nicotínico y *p*-amino-benzoico respecto a los valores de absorbancia de inositol. Como resultado de la evaluación de PCA surge que la absorbancia para inositol es alta, en tanto que es baja para ácido nicotínico y/o *p*-amino-benzoico para los datos de los ensayos correspondientes a invierno.

La componente 2 es la suma de las absorbancias de inositol y *p*-amino-benzoico. Se comprueba sobre el eje de la Componente 2 que los mayores valores ocurren en verano, mientras que los datos de los ensayos correspondientes a otoño se dispersan cerca del cero. Los datos de los ensayos de primavera son los más pequeños y se describen con valores bajos para inositol y *p*-amino-benzoico.

Finalmente en la Figura 4-23 se representa el análisis de los promedios de cada agrupamiento por tipo de fuentes considerando las distintas estaciones del año y todos los ensayos de tolerancia.

- TOTAL DE FUENTES DE CARBONO

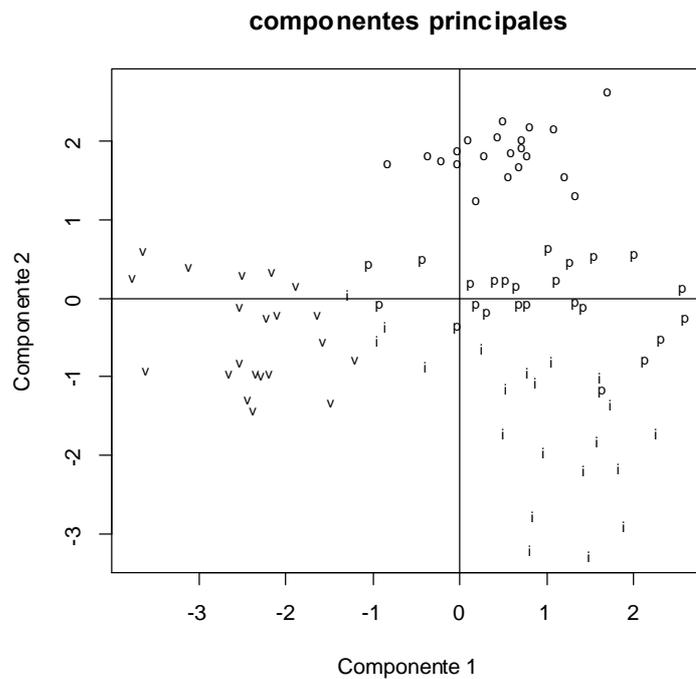


Figura 4-23. Análisis de Componentes Principales del consumo de los promedios de todos los tipos de fuentes de carbono. Se utilizan los resultados de verano (v), otoño (o), invierno (i) y primavera (p).

Se presenta en la Componente 1 la suma ponderada global con signo negativo. De esta manera aquellos grupos que presenten mayor absorbancia global se ubicarán los cuadrantes con valores negativos (I^o y II^o cuadrante) tal como sucede con los datos de los ensayos correspondientes a verano.

Por otro lado en la Componente 2 se contraponen los valores de absorbancias de los promedios de los aminoácidos y vitaminas respecto a las absorbancias de los ácidos orgánicos y los carbohidratos. De esta manera, los datos de los ensayos correspondientes a otoño presentan mayores valores de absorbancia de aminoácidos y/o vitaminas respecto a ácidos orgánicos y/o los carbohidratos, mientras que en los datos correspondientes a invierno sucede el comportamiento inverso.

4.4 Evaluación de la capacidad de la comunidad bacteriana y de las bacterias tolerantes aisladas de degradar atrazina y 2,4-D

Con el objetivo de evaluar si las comunidades bacterianas presentes en las muestras de agua superficial del embalse Los Molinos y de las bacterias tolerantes previamente aisladas tienen capacidad degradativa de atrazina y de 2,4-D se realizaron ensayos de biodegradación en sistemas *batch*. Para ello, tanto muestras extraídas en los monitoreos estacionales de verano, otoño, invierno y primavera como suspensiones de las bacterias tolerantes aisladas fueron expuestas a concentraciones de 0,2 µg/L de atrazina y de 20 mg/L de 2,4-D.

Como resultado de estos estudios no se comprobó remoción de atrazina para ninguna de las muestras ambientales extraídas del embalse Los Molinos evaluadas durante 77 días de incubación.

Respecto de las bacterias tolerantes no se halló que ninguna de estas cepas presentara capacidad degradativa de atrazina o 2,4-D bajo las condiciones de ensayo.

Con respecto al 2,4-D, se obtuvo evidencia de la remoción de compuesto durante la incubación de 77 días. En la Figura 4-28 se presentan los resultados de las cinéticas de biodegradación en las muestras estacionales.

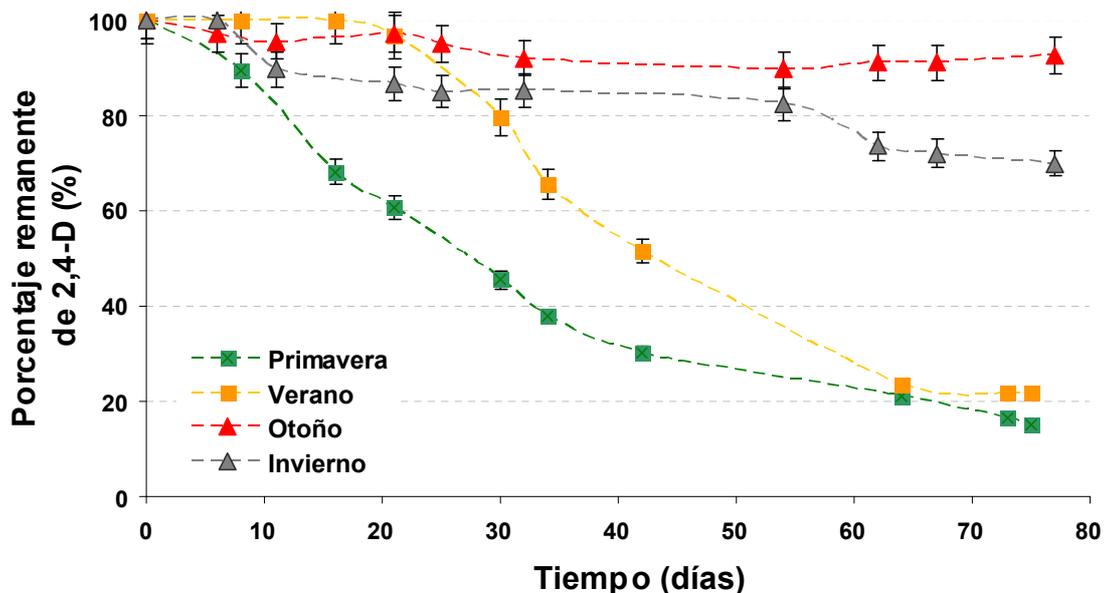


Figura 4-28. Porcentaje remanente de 2,4-D (20 mg/L) de las muestras extraídas en el monitoreo de verano (-■-), otoño (-▲-), invierno (-▲-) y primavera (-■-). Los ensayos se realizaron por duplicado.

En las muestras provenientes del monitoreo de primavera se verificó que el tiempo requerido para la degradación de 20 mg/L de 2,4-D fue de 75 días con una remoción de 85%. Este proceso mostró dos etapas, una tasa de degradación lineal durante los primeros 40 días de incubación llegando a una remoción de 70%, para luego disminuir la velocidad de degradación hasta completar el 85% en el período restante.

En las muestras provenientes del monitoreo de verano se obtuvo que el tiempo requerido para la degradación de 20 mg/L de 2,4-D fue de 75 días con una degradación del 78%. Además, se observó un periodo de latencia de aproximadamente 20 días, luego de lo cual se verificó el consumo del compuesto con una velocidad de consumo constante como el caso anterior.

En las muestras provenientes de los monitoreos de otoño e invierno, se obtuvo una baja tasa de degradación, siendo en el primer caso de 10% y en el segundo de 30%. En las muestras de invierno se observó un periodo de latencia de aproximadamente 20 días. La determinación de la concentración del compuesto en muestras de agua del embalse, previamente autoclavadas, permitió confirmar la ausencia de pérdidas abióticas.

5- DISCUSIÓN

• Biomasa y viabilidad bacteriana

El hecho que las bacterias heterótrofas sean las responsables de cumplir un rol esencial en el ecosistema microbiano por ser los organismos responsables de la degradación de la materia orgánica (Konopka *et al.*, 1998; López y Zaballos, 2005; Pernthaler y Amann, 2005), hace que su determinación sea relevante no sólo para caracterizar el sistema bajo estudio sino también para conocer cómo responde este grupo a diferentes condiciones adversas como la exposición a herbicidas.

En este trabajo se utilizó la técnica de recuento en placa utilizando como medio de cultivo el agar R2A que al contener bajas concentraciones de nutrientes permite el crecimiento de bacterias heterótrofas con una tasa de crecimiento lenta y/o que se encuentran injuriadas (Reasoner y Geldreich, 1985). Es así que el uso de este tipo de agar mostró ser adecuado para recuperar un importante número de bacterias cultivables heterótrofas presentes en las aguas del embalse Los Molinos luego de haber sido expuestas a diferentes concentraciones de atrazina y 2,4-D (Figuras 4-1 y 4-2). En este sentido, se pudo comprobar que las bacterias fueron capaces de tolerar y mantener su viabilidad, ya que pudieron proliferar en placa de Petri, incluso a altas concentraciones de los herbicidas durante los cinco días del ensayo de tolerancia. Las muestras que recibieron los tratamientos con atrazina no presentaron valores de recuentos bacterianos significativamente diferentes del control en ninguna de las estaciones evaluadas con excepción de la muestra A3 a T₁₂₀ en el ensayo de tolerancia con las muestras extraídas en verano y en otoño para las cuales se hallaron recuentos bacterianos menores (Figura 4-1). Sin embargo, cabe destacar que las colonias bacterianas crecidas en placa de Petri al finalizar los ensayos difirieron morfológicamente de aquellas de las muestras control. Este resultado señala que a pesar que los recuentos mostraron valores similares, las bacterias heterótrofas cultivables que pudieron crecer fueron aquellas más tolerantes a los compuestos ensayados.

En las muestras de agua que fueron tratadas con dosis crecientes de 2,4-D, las bacterias cultivables heterótrofas mostraron ser mucho más susceptibles a este compuesto, ya que se obtuvieron menores recuentos a mayor concentración respecto al control (Figura 4-2). Este efecto inhibitorio de la capacidad de crecer en placa fue significativo para todas las concentraciones evaluadas dentro de la primera hora de exposición al compuesto (T₁). A T₁₂₀ aquellas que fueron expuestas a la máxima

concentración presentaron recuentos bacterianos significativamente menores comparados con los controles, para todas las estaciones del año. En particular, en las muestras correspondientes a otoño e invierno la inhibición fue aún más marcada para todas las muestras tratadas.

Una forma de evaluar cómo responden las bacterias heterótrofas a la presencia de compuestos tóxicos, es realizar recuentos en medios de cultivo adicionados con el compuesto en estudio (Pritchard y Bourquin, 1985). Siguiendo el protocolo implementado por Godoy y col. (1999), se evaluaron las diferencias entre los recuentos de bacterias cultivables heterótrofas viables totales (BHC) de aquellas bacterias heterótrofas tolerantes (BHtol). Como resultado de ello, se halló que en las muestras que recibieron el tratamiento con atrazina en las estaciones invernales, los recuentos de BHtol fueron significativamente menores que los recuentos de BHC (Figura 4-3). Las diferencias halladas entre los recuentos de BHC y de BHtol sugieren que la capacidad de sobrevivir en un medio con atrazina no necesariamente está relacionada con la posibilidad de hallarse activas y conde capacidad de crecer y formar colonias en presencia de contaminantes. Es por ello que es posible discriminar entre bacterias heterótrofas que permanecen viables, aunque no activas, de aquellas bacterias tolerantes que se hallan metabólicamente activas a pesar de estar en contacto con compuestos tóxicos. Como han destacado algunos autores (Pritchard y Bourquin, 1985; Godoy *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2000) las bacterias que son tolerantes y que exhiben la capacidad de proliferar en presencia de compuestos tóxicos podrían cumplir un rol esencial en los procesos autodepurativos en ambientes contaminados.

Como se mencionó previamente, la técnica de recuento en placa representa sólo una fracción de las bacterias presentes en una muestra de una comunidad bacteriana natural (Porter *et al.*, 2004). Es por ello que se utilizó también el recuento de bacterias totales mediante el empleo de tinciones con DAPI. La cuantificación del número total de bacterias es relevante para caracterizar y determinar la productividad del ecosistema (Kepner y Pratt, 1994; Yu *et al.*, 1995; Fisher *et al.*, 2000). En diversos trabajos se ha destacado que la relación entre el número de bacterias totales y heterótrofas viables típicamente varía entre 2 a 3 órdenes de magnitud tanto en lagos (del Giorgio y Cole, 1998; Smith y del Giorgio, 2003) como en el océano (Bianchi y Giuliano, 1996), de manera que las bacterias heterótrofas cultivables en placa de Petri representan una proporción

menor al 1% respecto al número total de las bacterias presentes en el ambiente acuático (Pernthaler y Amann, 2005; Davey, 2011).

Como resultado del análisis de los recuentos realizados, se halló en primer lugar que el número de bacterias totales (BT) determinadas en los controles a T_0 y a T_{120} de los ensayos de tolerancia no difirieron en más de un orden de magnitud (Figura 4-4), destacando que luego de la incubación de 120 horas aumentó la biomasa bacteriana.

Las bacterias presentes en esas muestras de agua del embalse luego de ser incubadas a 20° C durante 5 días pudieran aumentar su biomasa al consumir la materia orgánica presente en el medio. El hecho de haber trabajado con muestras de agua filtradas por membranas de 0,8 μm , lo cual tuvo como fin de remover principalmente predadores, permitió que las bacterias presentes que se hallaban vivas pero no activas pudieran desarrollarse. Esto puede deberse a que las bacterias adoptan diferentes estrategias de evasión de la predación generalmente disminuyendo su actividad, aumentando o disminuyendo su tamaño (Hahn y Höfle, 2001; Smith y del Giorgio, 2003; Jardillier *et al.*, 2005; Yokokawa y Nagata, 2005). Por lo tanto, en cuanto las condiciones son favorables las bacterias comienzan a proliferar.

Esta respuesta de las bacterias de incrementar su actividad, una vez que son eliminados del medio los predadores, puede ser sugerida, en este trabajo, a partir de la relación de las de bacterias heterótrofas cultivables (BHC) respecto de las bacterias totales (BT) en los ensayos de tolerancia, la cual fue expresada en términos de porcentajes (Figura 4-4). Dichos porcentajes obtenidos en los controles a T_0 variaron entre 0,05% y 0,5% obteniendo el valor más bajo en la estación de invierno mientras que el valor más alto correspondió a la muestra de verano. Esto reflejaría la situación inicial en el ambiente acuático donde el grupo de bacterias heterótrofas cultivables se hallaría en una baja proporción respecto al número total de bacterias. A T_{120} , los porcentajes de bacterias cultivables en los controles de las muestras de los ensayos de tolerancia correspondientes a verano y a otoño se incrementaron 10 veces, mientras que en las muestras tomadas en invierno y en primavera el incremento fue de 100 y 450 veces respectivamente.

En las muestras tratadas con herbicidas se pudo comprobar que las bacterias heterótrofas cultivables (BHC) en relación con las bacterias totales (BT) respondieron de manera diferente al ser expuestas a atrazina o a 2,4-D. Estas respuestas diferentes en los recuentos bacterianos se hallaron asociados a los cambios en las condiciones ambientales de cada época del año. Las muestras tratadas con atrazina en los ensayos de tolerancia de

verano y de otoño, así como en las muestras tratadas con 2,4-D en los ensayos de verano, otoño e invierno los porcentajes de las muestras tratadas tuvieron una tendencia decreciente respecto al control a medida que se incrementó la concentración de los compuestos. En el caso de muestras tratadas con las tres concentraciones de atrazina en el ensayo de tolerancia correspondiente a invierno, se observó una tendencia hacia una relación BHC/BT mayor respecto a su control. Esta observación se explicaría por el hecho que se obtuvieron menores valores de bacterias totales en las muestras tratadas con atrazina en relación con su control, aunque los valores de recuento de bacterias heterótrofas cultivables fueron similares a su control. Esta observación sugeriría que en la comunidad bacteriana presente en el invierno luego de ser expuesta a atrazina, algunos grupos bacterianos tendrían una mayor susceptibilidad al compuesto mostrando menores incrementos de biomasa total, aunque las bacterias heterótrofas presentaron una mayor tolerancia al compuesto.

En el ensayo correspondiente a primavera, las muestras que fueron tratadas con atrazina mostraron una relación BHC/BT mayores en comparación al control. A pesar de que los valores porcentuales mostraron valores erráticos entre las muestras tratadas, este resultado indicaría que la atrazina no tendría un efecto inhibitor del crecimiento sobre la comunidad bacteriana heterótrofa, observándose incluso un incremento de la fracción de bacterias heterótrofas cultivables. Estas comunidades bacterianas de primavera una vez que fueron expuestas a la concentración baja e intermedia de 2,4-D (D1 y D2) mostraron una relación BHC/BT similares al control, mientras que la muestra D3 disminuyó su relación porcentual. Este resultado permitiría inferir la existencia de un efecto adverso sobre el crecimiento del grupo de bacterias heterótrofas cultivables expuestas a 2,4-D.

Durante la primavera es cuando se inicia el periodo de lluvias y el consecuente arrastre de materia orgánica alóctona desde las costas aledañas al embalse Los Molinos (Cossavella, 2001; 2003). En las muestras correspondientes a dicha estación se determinaron los valores más altos de carbono orgánico disuelto (TOC 4,7 mg/L. ANEXO II.2). Durante el ensayo de tolerancia con estas muestras se obtuvieron los recuentos más altos, tanto de bacterias heterótrofas cultivables como de bacterias totales. Los porcentajes respectivos mostraron valores elevados lo que podría indicar que la mayor disponibilidad de materia orgánica, al permitir el crecimiento bacteriano, reduciría el efecto inhibitorio que podría afectar su desarrollo.

Otra observación que surge de la comparación de los recuentos de BHC, y tal como se ilustra en las fotografías de la Figura III.A del Anexo III, las bacterias que crecieron en Placa de Petri provenientes de los ensayos de exposición a atrazina y a 2,4-D fueron morfológicamente diferentes respecto al control y entre sí. Se observó además que a mayor concentración de compuesto se incrementó la dominancia de uno o unos pocos grupos.

De los recuentos en placas de Petri que contenían concentraciones elevadas de ambos herbicidas (BHtol) se extrajeron las colonias tolerantes que fueron posteriormente identificadas por métodos moleculares. En total se pudieron identificar 15 cepas bacterianas de las 18 cepas inicialmente aisladas con un alto porcentaje de similitud de secuencias que permitió la designación taxonómica (Tabla 4-1). El 60% de los aislamientos correspondieron al género *Pseudomonas*; el 13% al género *Flavobacterium* y el restante 26% agrupa a los géneros *Staphylococcus*, *Blastomonas*, *Brevundimonas* y *Microbacterium*. En base a la mayor similitud de secuencias registradas en el GenBank, pudieron discriminarse a nivel de especie sólo 8 cepas. El mayor número de bacterias aisladas fueron identificadas como pertenecientes al género de *Pseudomonas* lo cual es consistente con numerosas publicaciones que describen al género *Pseudomonas* como un grupo con una amplia capacidad metabólica y un gran despliegue de mecanismo de resistencia aislados de ambientes contaminados como suelos, aguas, aguas subterráneas, efluentes industriales (Martins Dos Santos *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2011) con capacidad de degradar diversos contaminantes ambientales, como fenoles o benzoatos halogenados (Hickey y Focht, 1990; Rieger *et al.*, 2002; Abuhamed *et al.*, 2004); hidrocarburos (Whyte *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2003), pesticidas (Yanze-Kontchou y Gschwind, 1994; Mandelbaum *et al.*, 1995; Kopytko *et al.*, 2002; Barreiros *et al.*, 2008). Además, varias especies del género *Pseudomonas* han sido utilizadas como paradigmas de la biotecnología ambiental debido a su amplia versatilidad metabólica que le permite colonizar diferentes ambientes, desarrollar vías para mineralizar compuestos tóxicos ambientales, así como exhibir diversos mecanismos de resistencia (Loh y Cao, 2008; Wu *et al.*, 2011). Además se comprobó que de las 15 cepas identificadas, casi una tercera parte de las bacterias tolerantes resultaron ser tolerantes a ambos compuestos, todas ellas Pseudomonales. El hecho de que se detecten diferentes grupos tolerantes a la atrazina y el 2,4-D podría indicar que cada herbicida ejerce efectos diferentes sobre los mecanismos de tolerancia de las bacterias heterótrofas cultivables.

Dentro del grupo de los heterótrofos las Pseudomonadales y Flavobacteriales son los grupos con mayor número de representantes. Una de las características de este último grupo es que abundan en ambientes acuáticos como agua dulce y océanos (Kirchman 2002). Bacterias pertenecientes al género *Flavobacterium* también han sido citadas frecuentemente en la bibliografía por su capacidad para degradar una amplia variedad de contaminantes ambientales como naftaleno (Baoli *et al.*, 1998), pentaclorofenol (Lo *et al.*, 1998), hidrocarburos aromáticos (Hemalatha y Veeramanikandan, 2011). Algunos autores, como Amon y Benner (1996) han hallado que este grupo conforma un gran parte de los degradadores de polímeros como celulosa y quitina, y gran parte de las moléculas de gran tamaño que conforman la fracción de materia orgánica disuelta en ambientes acuáticos.

En cuanto a las bacterias de los géneros *Blastomonas* y *Brevundimonas* ambas pertenecientes a la clase de las Alfa-proteobacteria, han sido descritas formando parte de comunidades microbianas tanto de suelos como de ambientes acuáticos. También presentan un amplio espectro de capacidades metabólicas y han sido descritas por su capacidad de metabolizar contaminantes ambientales altamente tóxicos y persistentes. Como ejemplo de ello se puede mencionar el trabajo de Krausova y col. (2006) quienes aislaron de un ambiente estuarino impactado por efluentes industriales un consorcio formado por los géneros de *Brevundimonas* y *Pseudomonas* que lograron remover cerca del 80% de diclorometano. Asimismo, un especie de *Brevundimonas* fue descrita con capacidad de degradar diferentes compuestos de PAH en aguas superficiales (Chang *et al.*, 2007).

Otra de las cepas tolerantes aisladas son *Blastomonas*. Al igual que los otros miembros de la familia Shingomonadaceae estas bacterias se caracterizan por ser heterótrofas aerobias estrictas con una pigmentación amarilla característica, lo cual se ha observado en las cepas aisladas en este trabajo. Estas bacterias se encuentran distribuidas ampliamente en la naturaleza desde suelos hasta superficie de plantas, aunque se las aísla frecuentemente en ambientes acuáticos desde aguas oligotróficas a altamente eutróficas (Blakwill *et al.*, 2006). Esta capacidad de poder colonizar ambientes tan diversos tiene relación con su habilidad de degradar compuestos orgánicos contaminantes. Uno de los aspectos de la biología de estas bacterias más interesante es que presentan diversos patrones de múltiple resistencia a antibióticos y presentan la capacidad de formar biofilms, mecanismos que las han hecho competidores efectivos a la

hora de colonizar ambientes y resistir condiciones de estrés (Furuhata *et al.*, 2007; Stolz, 2009; Vaz-Moreira *et al.*, 2011).

Dentro del grupo de bacterias que fueron identificadas como tolerantes a los herbicidas en las muestras de agua del embalse Los Molinos, se confirmó que las cepas Gram positivas pertenecen a los géneros *Staphylococcus* y *Microbacterium*. Si bien la presencia de estos géneros en el ambiente despierta un mayor interés clínico, en trabajos recientes de Jackson y col. (2009, 2012) los autores hallaron que especies de los estos géneros mencionados presentaron múltiple resistencia a metales pesados como zinc, aluminio, níquel en muestras provenientes del río Plankenburg que atraviesa una zona industrial en Ciudad del Cabo, Sudáfrica.

En suma, es consistente con muchos trabajos científicos el hecho de haber hallado que los grupos bacterianos tolerantes a los herbicidas son bacterias que han sido ampliamente descritas como tolerantes a compuestos tóxicos, contando además con buenos candidatos que potencialmente podrían ser los responsables de remover esos herbicidas del ambiente.

Diversos autores han utilizado fluorocromos vitales para realizar tinciones selectivas para el estudio de la viabilidad bacteriana en muestras de ambientes naturales. Las tinciones con fluorocromos presentan un gran potencial para el *screening* rápido de las condiciones que predominan en los ambientes naturales, ya que dilucidar si las bacterias se encuentran activas, en dormancia o muertas es de sumo interés para comprender los mecanismos que subyacen a la funcionalidad de los ecosistemas (Boulos *et al.*, 1999; Berney *et al.*, 2007; Kramer *et al.*, 2009).

A partir de la calibración de los parámetros citométricos mediante el empleo de una cepa pura de *Pseudomonas putida* se pudieron identificar diferentes agrupamientos relacionados a estados metabólicos y celulares (Figuras 3-3 y 3-4). Esto se efectuó utilizando el kit comercial de viabilidad (BD- *Viability kit*) contando con los fluorocromos TO y PI ya descritos.

Esta distinción entre diferentes estados metabólicos se basa en la permeabilidad selectiva a los fluorocromos y de su afinidad por los ácidos ribonucleicos. Para permitir la translocación de moléculas al interior de las células se utiliza EDTA, que si bien se ha demostrado que no afecta la viabilidad, en las bacterias Gram negativas puede presentarse resistencia tal como ha sido demostrado en el trabajo de Berney y col. (2007) quienes observaron que en *E. coli* y *Salmonella* sp. la presencia de la membrana externa

representó, hasta cierto punto, una barrera para el ingreso del marcador SYTO9 (similar al TO). Alakomi y col. (2003) señalaron además, en un trabajo realizado en cepas de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, que el efecto permeabilizante del EDTA es mucho mayor durante la fase de crecimiento exponencial mientras que disminuye en estadios posteriores del crecimiento bacteriano. Más aún, no sólo los marcadores deben atravesar diversas barreras en la membrana plasmática que impiden su ingreso sino que una vez dentro de la célula deben llegar al sitio blanco donde van a interactuar. En este sentido Davey (2011) señaló que cuando esto no ocurre, o sucede parcialmente, puede conducir a conclusiones erróneas.

Cuando una población de células es expuesta al estrés, dependiendo de su magnitud puede haber una heterogeneidad de respuestas, desde mortalidad hasta distinto grado de daño. Sin embargo, la identificación de esos estados dependerá del tipo de marcación, y de cómo atraviesa la membrana celular. En trabajos de Davey y Hexle (2011), los autores han demostrado que en células estresadas de *Saccharomyces cerevisiae* el marcador PI puede penetrar las membranas durante o inmediatamente posterior a la condiciones de estrés y que luego de un periodo corto de recuperación las membranas pueden resistir el ingreso del marcador.

Las bacterias ambientales en general provienen de una mezcla muy heterogénea con múltiples interacciones, las cuales bajo condiciones de estrés pueden manifestar marcaciones intermedias de viabilidad.

En este trabajo se analizaron las comunidades bacterianas naturalmente presentes en las muestras de agua del embalse Los Molinos extraídas en diferentes estaciones del año bajo las categorías señaladas en **Materiales y Métodos** como “Vivas activas y no activas”, “Muertas” e “Injuriadas”. Aunque estas categorizaciones se han presentado mucho más dispersas en el área del citograma y eso depende del tamaño celular, del tipo de bacterias y de los estados metabólicos particulares que pueden dar diferentes patrones de marcación. Por ello es difícil circunscribir cada grupo por separado ya que en muchos de los casos resulta un continuo de eventos siendo subjetiva la división entre categorías (Figuras 4-5 y III.B1-3 del ANEXO III). Esto no significa que no sea útil implementar la marcación de viabilidad, sino que los resultados que se obtienen deberían ser analizados como orientativos o semi-cuantitativos, al menos en una etapa inicial de estudio. Berney y col. (2007) también fueron prudentes al presentar sus resultados ya que comprobaron que el uso de marcadores de viabilidad en una comunidad bacteriana natural de agua dulce, si bien no permite diferenciar categóricamente entre los diversos

estados metabólicos si ofrece resultados que permiten la comparación entre diferentes condiciones ambientales.

No obstante el empleo de la citometría de flujo en éste trabajo permitió observar importantes diferencias entre los controles de las diferentes muestras estacionales a tiempo inicial (T_0). Estas muestras reflejan el estado y composición de las comunidades bacterianas presentes en el ambiente natural provenientes de las diferentes estaciones del año, las mismas mostraron diferentes proporciones de los distintos agrupamientos. En este sentido, se comprobó una marcación mayor para el agrupamiento de bacterias “Vivas-activas” en las muestras correspondientes a verano, mientras que en las de otoño predominó la marcación de bacterias “Injuriadas”. En las muestras correspondientes a invierno, predominó la marcación de la categoría “Muertas” y en las de primavera se obtuvieron agrupamientos con una muy alta marcación de bacterias “Vivas-no activas”. Estas diferencias podrían estar dando cuenta de distintas composiciones estructurales en las comunidades bacterianas a lo largo del año.

En todos los ensayos de tolerancia a los herbicidas los porcentajes de mortalidad se incrementaron en las muestras tratadas respecto a sus controles. En todos los casos los grupos tratados con la concentración más alta de atrazina (A3), mostraron el mayor porcentaje de mortalidad respecto a las otras muestras y al control. De la comparación de las muestras expuestas a ambos compuestos, se observó que los porcentajes de mortalidad fueron en general mayores en los grupos expuestos a 2,4-D. Por otra parte los agrupamientos de bacterias “Muertas” fueron mayores que los de bacterias “Injuriadas”.

Del análisis estacional se comprueba que en el ensayo de tolerancia correspondiente a primavera las comunidades bacterianas mostraron valores relativamente similares entre el control y las muestras tratadas con atrazina y con 2,4-D. En este ensayo los porcentajes más altos correspondieron a la categoría de bacterias “Vivas-No activas”. Esto podría sugerir que la comunidad bacteriana presente en el embalse durante la primavera presenta una mayor resiliencia y estabilidad frente al impacto que representa la exposición a compuestos contaminantes y potencialmente tóxicos como son la atrazina y el 2,4-D. Contrariamente, en las otras estaciones del año se observó mayor vulnerabilidad de las comunidades expuestas a los herbicidas.

Con el empleo de la técnica de citometría de flujo se pudo demostrar que la exposición a atrazina y 2,4-D produce cambios a nivel celular en las bacterias presentes en las muestras de agua del embalse. En este sentido, el incremento de los porcentajes de mortalidad e injuria en los grupos que fueron expuestos sugeriría que estos herbicidas

podrían ejercer su efecto tóxico mediante la desestabilización de las membranas plasmáticas tal como lo ha sugerido Davey (2011).

La representación de los parámetros citométricos FitC-H vs. SSC-H (ANEXO III) permitió discriminar entre las bacterias con mayor marcación de TO respecto al biovolumen. En las Figuras 4-5 y III.B1-3 del Anexo III se puede evaluar la distribución de tamaños de las bacterias en relación con la marcación de viabilidad. En las cuatro estaciones, tanto en los controles como en las muestras tratadas con atrazina y 2,4-D el agrupamiento identificado como bacterias “Muertas” (color verde), se distribuyó en general hacia valores altos en el eje de SSC-H. Esto indicaría que las bacterias “Muertas” e “Injuriadas” tienden a presentar un mayor biovolumen, mientras que en general la marcación de viabilidad (color azul) se localizó hacia valores bajos en el eje SSC-H indicando un biovolumen menor.

En apoyo a lo expuesto por Berney y col. en el trabajo citado anteriormente, se sugiere profundizar la investigación sobre el uso de los marcadores de viabilidad con el objetivo de poder estandarizar métodos de análisis. Cada marcador fluorescente presenta diferencias estructurales y la forma de ingresar al interior de las células y teñir varía dependiendo del tipo de bacteria y de su estado metabólico e integridad celular. No cabe duda que la técnica es poderosa y se requiere del desarrollo de protocolos orientados a ajustar las diferencias entre los grupos bacterianos de muestras provenientes de diferentes matrices y ambientes.

En virtud de que la técnica utiliza marcadores fluorescentes que se pegan a los ácidos nucleicos (Kepner y Pratt, 1994), diversos autores han propuesto que una mayor marcación del fluorocromo esta directamente relacionada con un mayor contenido de ADN y esto a su vez asociado con la actividad de las bacterias (Lebaron *et al.*, 2001; Porter *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2005). En esta línea, se han publicado un gran número de trabajos realizados en muestras de agua de mar donde los autores concluyeron que la tasa de crecimiento, entendida como actividad bacteriana, de las células más grandes (biovolumen $>0,25 \mu\text{m}^3$), fue mayor que la registrada para células más pequeñas (Servais *et al.*, 2001; Nishimura *et al.*, 2005). Es más, este enfoque ha sido utilizado en los últimos años por los microbiólogos acuáticos para discriminar entre subgrupos diferentes de bacterias, y por lo menos dos subgrupos de bacterias se encuentran generalmente en los ecosistemas acuáticos estudiados (Servais *et al.*, 2000; Nishimura *et al.*, 2005). Si bien, en general los marcadores de ácidos nucleicos se unen tanto al ADN como al ARN, la mayoría

de la fluorescencia está ligada al primero (Gasol *et al.*, 1999). En suma, los dos subgrupos se han denominado como alto contenido de ADN (sus siglas en inglés HDNA) y de bajo contenido de ADN (sus siglas en inglés LDNA). En varios trabajos se ha propuesto que las células HDNA son aquellas que exhiben mayor actividad en comparación con las células LDNA (Jellett *et al.*, 1996; Gasol *et al.*, 1999). No cabe duda que aún queda mucho para comprender acerca de la relación entre HDNA y LDNA, su composición y su participación dentro del ecosistema.

Este trabajo constituye el primer estudio que demuestra un enfoque directo de las diferentes categorías bacterianas y de las características que pueden presentar en el ambiente natural del embalse Los Molinos. Aunque no hay evidencia fuerte de que el contenido de ácido nucleico de las células individuales sea suficiente para diferenciar entre las células menos activas y las más activas, debería sumarse a este enfoque otras técnicas adicionales que determinen otros parámetros fisiológicos para mejorar la discriminación entre viabilidad y actividad metabólica.

- **Estructura genética de las comunidades bacterianas**

La técnica de DGGE basada en la separación electroforética de fragmentos de los genes de la subunidad 16S ribosomal es una herramienta valiosa para monitorear cambios en el seno de una comunidad bacteriana y así evaluar el impacto de factores externos como contaminantes ambientales (Muyzer *et al.*, 1993; Foley *et al.*, 2008).

Del análisis de los perfiles de DGGE realizado en las muestras de agua del embalse Los Molinos se halló que en las condiciones iniciales (T_0) las comunidades bacterianas mostraron una estructura más rica y diversa que la hallada al finalizar el ensayo de exposición (T_{120}). Es decir que la estructura de comunidad bacteriana se modificó por efecto de la incubación durante 5 días. Si bien, los valores de los índices de diversidad de Shannon mostraron una pequeña disminución entre los controles a T_0 y a T_{120} , los patrones de bandas de los perfiles de DGGE presentaron una moderada a baja similitud con valores menores al 68%. Habiendo observado que el número de bacterias totales en las muestras control se incrementó alrededor de un orden de magnitud a T_{120} (Figura 4-4), se corrobora en el análisis de DGGE que el efecto de la incubación favoreció el crecimiento de algunos grupos bacterianos respecto a otros. Es por ello que se observa en los perfiles del control a T_{120} que algunas bandas mostraron una mayor intensidad de marcación mientras que otras aparecen casi imperceptibles en comparación con el perfil a T_0 . La excepción se obtuvo en el ensayo correspondiente a la estación de primavera

donde el control a T_0 presentó menor diversidad genética respecto al control a T_{120} , aunque esto podría deberse a la baja intensidad de las bandas (Figuras 4-7 a 4-10). Asimismo, de la comparación de los perfiles de bandas de los DGGE de los controles a T_0 se pudo comprobar que las comunidades bacterianas presentaron composiciones muy diferentes entre si, lo cual revela una gran variabilidad a lo largo del año.

Se observó además un mayor número de bandas en los controles a T_0 de los ensayos correspondientes a otoño e invierno respecto a los controles a T_0 de los ensayos correspondientes a verano y primavera. Estos resultados podrían deberse a que la técnica amplifica más las secuencias que se encuentran en mayor proporción (Muyzer *et al.*, 1993; Muyzer y Smalla, 1998; Edwards *et al.*, 2001). En otras palabras, es posible que durante los meses invernales, al disminuir las tasas de actividad metabólica debido a las bajas temperaturas, o bien a la disminución de los efectos de competencia (intra- e interespecífica) por nutrientes, pueden detectarse grupos genéticos raros que se hallaban en una baja proporción, es por ello que se revela una mayor biodiversidad en estas muestras que en las que provienen de las meses de primavera y verano (Figuras 4-7 a 4-10). Sustenta esta afirmación el hecho de haber detectado en las muestras de otoño e invierno recuentos bajos de bacterias heterótrofas cultivables (BHC) y de bacterias totales (BT) (Figura 4-4). Es así que en la comparación de las nuestras control a T_0 se confirmó que existe una relación inversamente proporcional entre el número inicial de bacterias y el número de bandas detectadas en los perfiles de DGGE.

Como resultado del análisis de los ensayos de tolerancia se observaron diferencias en los perfiles de los DGGE asociados con la exposición a atrazina y a 2,4-D. No sólo la presencia de los herbicidas modificó las estructuras de las comunidades respecto al control a T_{120} , sino que también estuvo asociada a la concentración de cada compuesto (Figuras 4-7 a 4-10).

En el caso de los ensayos de tolerancia a atrazina correspondientes a verano y primavera se observó que las muestras A1 y A2 mostraron una alta similitud de bandas (72 y 85% respectivamente), incluso mayor respecto al control a T_{120} . Por otra parte, en los ensayos correspondientes a otoño e invierno, las muestras que presentaron una alta similitud de bandas fueron A1 y el control T_{120} con valores de 70 y 72%, respectivamente. Sin embargo, en estos ensayos se observó también que la muestra A2 tuvo un incremento tanto en riqueza como en diversidad respecto a cada control a T_{120} y la muestra A1. Se destaca que en todos los ensayos realizados las muestras que recibieron la concentración más alta de atrazina (A3) presentaron los valores más bajos de similitud de los perfiles de

bandas del DGGE. Asimismo, estas muestras exhibieron una menor composición genética, expresado tanto en número de bandas (riqueza), como en valores bajos de los índices de diversidad de Shannon. Estos resultados sugieren que la exposición a diferentes concentraciones de este herbicida induce cambios en el ensamblado y la abundancia de las poblaciones observando en los DGGE el mayor predominio de las poblaciones más tolerantes.

Los resultados de los ensayos de tolerancia al 2,4-D correspondientes a verano, otoño e invierno, revelaron que a medida que se incrementó la concentración del compuesto aumentó también la detección de bandas en el perfil de DGGE así como el valor del índice de diversidad (Figuras 4-7 a 4-9). Si bien cabe aclarar que tanto las muestras que fueron expuestas a la concentración más baja e intermedia de 2,4-D mostraron valores de los índices de diversidad siempre por debajo del control a T₁₂₀, la muestra D3 mostró valores superiores. Resultados opuestos se obtuvieron con las muestras tomadas del ensayo correspondiente a la estación de primavera, donde al aumentar la concentración de compuesto disminuyeron el número de bandas y los valores de diversidad (Figura 4-10).

En las muestras expuestas a atrazina y 2,4-D se observaron pocas bandas con una fuerte intensidad de marcación comparado con los controles. Estos resultados indican en primer lugar que el efecto de la incubación cambia la composición y estructura de la comunidad bacteriana con un pequeño enriquecimiento de algunas bandas y pérdida de otras. Sin embargo este hecho no invalida la posibilidad de observar cambios en la diversidad bacteriana producto de la exposición a los herbicidas. En estas muestras de la estación de verano se halló que la presencia de atrazina en dosis crecientes disminuyó la complejidad de la estructura de la comunidad reflejado como número de bandas e índice de diversidad. El tratamiento con 2,4-D también produjo cambios en la comunidad bacteriana por pérdida de la diversidad genética y cambio en la estructura de la comunidad.

Las diferencias en cuanto a los índices de diversidad de Shannon-Weaver y el número de bandas entre las muestras tratadas con atrazina y con 2,4-D respecto a sus controles, así como las diferencias halladas entre las distintas estaciones del año pueden relacionarse con los recuentos de bacterias presentados anteriormente en las Figuras 4-1 y 4-2. En los ensayos de tolerancia correspondientes a verano y primavera a T₁₂₀ se registraron los recuentos más altos tanto de bacterias totales como de bacterias heterótrofas cultivables. Estos resultados pueden explicar porqué se obtiene en estas

muestras perfiles de bandas menos diversos y más homogéneos, ya que predominan pocos grupos bacterianos que dominan la comunidad. Contrariamente, en los ensayos correspondientes a otoño e invierno, tal como se mencionó anteriormente, si bien se hallaron los recuentos más bajos también se detectó una mayor diversidad genética que permitió discriminar mejor el efecto de los herbicidas sobre los cambios en la composición de estas comunidades bacterianas.

El método de PCR-DGGE presenta algunas limitaciones metodológicas que pueden conducir a una incorrecta interpretación de la estructura de la comunidad por sobre- o subestimación de la complejidad de la misma, como por ejemplo: la imposibilidad de separar todos los fragmentos de una comunidad diversa y compleja, la presencia de múltiples copias del gen que pueden dar diferentes bandas para una misma especie, la co-migración de bandas que se manifiesta en una mayor intensidad de marcación que se ubiquen en una misma posición en el gel aunque constituyen secuencias del gen diferentes (Marzorati *et al.*, 2008).

A pesar de dichas limitaciones diversos autores sostienen que esta técnica es particularmente adecuada y proporciona información muy valiosa a la hora de comparar cambios en la composición de las comunidades bacterianas, tanto en el tiempo como en el espacio para un ambiente dado (Berdjeb *et al.*, 2011; Singh y Ramaiah, 2011). En este trabajo se pudo apreciar mediante el análisis de bandas de DGGE que la exposición a atrazina y a 2,4-D indujo cambios en las arquitecturas en las poblaciones bacterianas expuestas lo que confirmaría la ocurrencia de procesos de adaptación a los herbicidas dando lugar a comunidades más resistentes y tolerantes.

Estos resultados son consientes con otros estudios reportados en la bibliografía, como por ejemplo el trabajo realizado por Foley y col. (2008), quienes evaluaron la respuesta de una comunidad bacteriana proveniente de agua de escorrentía de una región con actividad agrícola en Oregón (Estados Unidos) expuesta a un uso frecuente del herbicida acetochlor. El empleo de la técnica de DGGE permitió confirmar un efecto adverso del compuesto sobre la estructura de las comunidades a medida que se incrementaba la concentraciones (1 a 500 µg/L) observando una disminución en el número de bandas detectados.

- **Función metabólica de las comunidades bacterianas**

Uno de los aspectos que siempre surge al evaluar la respuesta metabólica de la comunidad bacteriana está relacionado con el hecho de que no se sabe qué proporción

de la comunidad ni qué grupo consume cada fuente de carbono en particular. En este sentido, y tal como lo menciona Konopka y col. (1998) el desarrollo del color en las microplacas como producto del consumo de las fuentes de carbono, bien puede estar relacionado con la dominancia de un grupo bacteriano que puede estar presente en un número alto de individuos al inicio de la incubación, o bien tienen una alta tasa de crecimiento. Los autores señalan que no es posible conocer, ni *a priori* ni *a posteriori*, si el consumo de fuentes de carbono esta relacionado con una composición particular de la comunidad bacteriana, o si la presencia de una fuente en particular resulta un medio selectivo que permite el enriquecimiento de aquellas bacterias que tienen una tasa alta de crecimiento. Sin embargo, lejos de ser un obstáculo, las técnicas que evalúan el perfil fisiológico de la comunidad bacteriana (como sus siglas en inglés CLPP) permiten cuantificar y determinar como impactan diferentes parámetros individuales, como factores fisicoquímicos o compuestos tóxicos, en la respuesta metabólica global (Insam y Goberna, 2004; Fraç *et al.*, 2012).

Otro de los aspectos que más se ha discutido sobre esta técnica de CLPP y la determinación de la capacidad metabólica de las comunidades microbianas tiene que ver con la adecuada elección de las fuentes de carbono en relación con la disponibilidad de los mismos en los ambientes naturales (Boivin *et al.*, 2005). Por lo cual se ha cuestionado el uso de las técnicas comerciales basadas en el BIOLOG, por ser poco claras al interpretar los datos de consumo de las fuentes de carbono. En su defensa, autores como Konopka y col. (1998), plantean que en realidad en los diferentes ecosistemas las fuentes de carbono presentes no solo varían en tipo sino que su concentración y biodisponibilidad puede variar también ampliamente. Aunque si puede considerarse que en función de las características de ciertos tipos de ambientes pueden llegar a estandarizarse ciertas fuentes de carbono, por ejemplo (a) en los ecosistemas acuáticos es el fitoplancton el que aporta las principales fuentes de carbono que emplean los microorganismos, (b) en los ecosistemas terrestres son los exudados de las plantas y raíces, e incluso los tejidos de plantas vivas, las principales fuentes de sustratos para la comunidad bacteriana y (c) por otro lado en los ecosistemas animales el origen de la materia orgánica determinará el tipo de rol funcional que predominará (Torres-Ruiz *et al.*, 2007). En esta misma línea de argumentación, Campbell y col. (2003) también han planteado en sus trabajos que el uso de sustratos con mayor valor ecológico, como los exudados de las raíces de plantas, aumenta el poder discriminatorio y la relevancia de la caracterización funcional cuando se analizan las comunidades bacterianas en muestras de suelo.

Por lo expuesto, surge que la mejor estrategia para evaluar las comunidades bacterianas de diferentes ambientes es armar un sistema propio con fuentes de carbono basado en el conocimiento del medio que se pretende estudiar, tal como lo propone Victorio y col. (1996). Estos autores, con el objetivo de caracterizar la comunidad bacteriana presente en un efluente industrial, generaron su propio sistema de fuentes de carbono incluyendo compuestos que estaban presentes en los efluentes de pulpa, de un total de 96 fuentes de carbono, 35 de ellas fueron compuestos fenólicos con distinto grado de halogenación. Mientras que los 60 sustratos restantes coincidieron con aquellos propuestos por los métodos comerciales. Los investigadores hallaron que el patrón de consumo de los compuestos fenólicos fue más distintivo y permitió una mejor evaluación del estado metabólico de la comunidad bacteriana presente en el efluente.

Tal como se plantó en la sección de Materiales y Métodos de este capítulo, en este trabajo se tomó como base el sistema BIOLOG^(R) y se armaron las microplacas con sustratos fácilmente degradables, y que pueden formar parte de compuestos que se hallan en la naturaleza. Otro cambio aportado es que todas las fuentes de carbono se prepararon cuidando que la concentración final sea 50 mg/L. Esta concentración es mucho menor que la que utiliza el sistema BIOLOG^(R), lo cual permitiría que un número mayor de especies bacterianas utilicen los sustratos, intentando evitar la competencia y que un grupo domine el consumo de ese sustrato.

Como primera observación del análisis de los perfiles de consumo de fuentes de carbono, se puede destacar que los grupos control tomados en las diferentes estaciones del año, presentaron distintos tipos de fuentes de carbono consumidas e incluso con diferentes intensidades. Este fenómeno tal como lo destacan otros autores, pone de manifiesto la flexibilidad metabólica de las comunidades bacterianas.

Como resultado se obtuvieron diferentes perfiles de consumo de sustratos entre los controles correspondientes a las diferentes estaciones del año; así como también entre las muestras que fueron tratadas con diferentes concentraciones de atrazina y 2,4-D, donde los cambios fueron mayores a mayor concentración de los herbicidas (Figuras 4-11 a 4-14). Además, se pudo comprobar que la exposición a atrazina o a 2,4-D produjo cambios diferentes en los perfiles de consumo de fuentes de carbono, posiblemente debido a que estos compuestos inducen cambios estructurales diferentes.

En primavera se halló que los grupos expuestos a las concentraciones más bajas, tanto de atrazina como de 2,4-D (A1 y D1), presentaron perfiles de consumo y diversidad

funcional muy similar a los controles (Figura 4-14), destacando que las comunidades bacterianas podrían no verse afectadas en cuanto a su desempeño metabólico.

En los meses estivales (verano y primavera) se observó que la tolerancia es mayor a ambos herbicidas. Incluso cuando las comunidades fueron expuestas a concentraciones altas de herbicidas, incluso se observó en estos ensayos un consumo mayor de fuentes de carbono.

Otro problema fundamental que surge del uso de fuentes de carbono para determinar cambios en la diversidad bacteriana, es que la técnica no refleja cambios en la estructura de las poblaciones. El problema radica en que puede existir redundancia metabólica, lo cual significa que diferentes especies bacterianas pueden utilizar el mismo sustrato, de manera que grandes cambios a nivel de diversidad genética puede representar un leve cambio a nivel de diversidad funcional reflejada en el perfil de utilización de fuentes de carbono (Konopka *et al.*, 1998). Es casi seguro que para los sustratos fácilmente degradables existe una importante redundancia metabólica, de manera que la pérdida de algún grupo bacteriano no se va a identificar en el consumo total de ese sustrato orgánico.

La evaluación del perfil metabólico refleja el potencial funcional de una comunidad bacteriana, pero se ha cuestionado el valor de los cambios en las tasas de consumo relativas de cada sustrato ya que puede estar enmascarando diferentes fenómenos de la dinámica poblacional. Es por ello, que los investigadores coinciden en la necesidad de complementar esta metodología con otras técnicas que evalúen otros parámetros microbiológicos (Garland, 1996).

Garland (1997, 1999) ha puntualizado la necesidad de estandarizar la densidad bacteriana ya que el consumo de fuentes de carbono es dependiente del número de bacterias. Debido a que los valores obtenidos a T_{120} del ensayo de tolerancia alcanzaron valores del orden de $1,0 \times 10^6$ células/ml, tomando en consideración todas las muestras tratadas y control de las cuatro estaciones del año (Figura 4-4) es que se consideró válido comparar los consumos de fuentes de carbono sin requerir ajustes en las densidades bacterianas. Además, y siguiendo con la propuesta de Garland (1996; 1997), las comparaciones de las tasas de consumo de fuentes de carbono entre diferentes ecosistemas o grupos tratados, puede ser válido siempre y cuando los datos obtenidos sean normalizados, efectuando la división del valor de cada pocillo por la respuesta metabólica promedio-RMP.

La técnica permite valorar en que medida la presencia de un compuesto tóxico en un ecosistema acuático está asociada a una pérdida o inactivación de las especies bacterianas que cumplen una función clave dentro del ecosistema, lo que podría provocar una alteración del balance del sistema.

El análisis temporal permitió comprobar como en las distintas estaciones del año, las comunidades bacterianas modifican los perfiles de consumo. Así, se observó que en verano, el grupo control consumió una mayor proporción de aminoácidos, aunque una menor proporción de carbohidratos respecto al consumo exhibido por las muestras tratadas. Tal como se presentó en la Figura 4-16.A, se pudo ver que la diversidad metabólica es alta e incluso mayor en los grupos que fueron tratados con 2,4-D. Esto puede deberse a que en estas muestras las comunidades bacterianas utilizaron los ácidos orgánicos como fuentes de carbono adicionales.

En el ensayo de tolerancia con las muestras de otoño se observó un escenario diferente con un bajo consumo de los distintos tipos de fuentes de carbono. Las muestras que fueron expuestas a atrazina presentaron un incremento en el consumo de otras fuentes de carbono, a medida que se incrementó la dosis de atrazina. Es así, que en las muestras A2 y A3 aumentó el consumo de aminoácidos y se incorporó el consumo de vitaminas. Estos resultados son congruentes con el hecho de hallar en estas muestras un número alto de sustratos consumidos y una alta diversidad metabólica (Índice de Shannon-Figura 4-15.A). Los resultados obtenidos para las muestras expuestas a 2,4-D exhiben otro escenario. En estas muestras las bacterias aumentaron el consumo proporcional de carbohidratos comparado con el control, pero disminuyó el consumo de aminoácidos. Además las bacterias de la muestra D3 presentaron la capacidad de utilizar ácidos orgánicos. Cabe señalar que, a diferencia de las muestras tratadas con atrazina, las tratadas con 2,4-D mostraron un menor número de fuentes de carbono utilizadas y valores decrecientes de diversidad metabólica en función de la concentración del compuesto. En la Figura 4-15.C y 4-15.D se verificó que las muestras tratadas presentaron una mayor dominancia y una baja similitud respecto al control. Estos resultados en conjunto permiten inferir que las comunidades en esta estación del año son mucho más vulnerables a la presencia de los herbicidas, exhibiendo cambios sustanciales en la composición y en la capacidad metabólica.

En las muestras del ensayo correspondiente a invierno (Figura 4-16.C) se comprobó que los perfiles de consumo fueron menores al control aunque mantuvieron una proporcionalidad similar de consumo de cada tipo de sustrato. En las muestras que

recibieron tratamiento con atrazina, se observó que las proporciones de todos los tipos de sustratos van disminuyendo a medida que se incrementó la concentración. Aunque cabe destacar que, si bien esta tendencia a menores consumos relativos esta directamente asociada a menores valores de diversidad metabólica, también se comprueba que progresivamente se incrementó la dominancia, al tiempo que disminuyó la similitud respecto al control en los que recibieron dosis crecientes de atrazina. Esto indica que las comunidades bacterianas que fueron expuestas a atrazina, mantienen la capacidad de utilizar diferentes tipos de sustratos, aunque el número es menor (Dominancia) y solo unos pocos son utilizados con una mayor intensidad (Equitatividad). En las muestras expuestas a 2,4-D, se observó una tendencia similar a la hallada para las muestras tratadas con atrazina, donde a medida que se incrementó la concentración disminuyeron las proporciones y el número de los sustratos consumidos. Además, se obtuvieron menores valores de Diversidad de consumo y un mayor valor de Dominancia a medida que se incrementó la dosis de 2,4-D. Si bien tanto la Similitud como la Equitatividad entre las muestras D1, D2 y D3 se hallaron dentro de un mismo rango de valores, aunque distintas del control. Se comprobó que las comunidades bacterianas presentaron una alta vulnerabilidad a medida que se incrementó la concentración de compuesto.

En las muestras del ensayo correspondientes a primavera (Figura 4-16.D) se observó que la respuesta de las comunidades a las diferentes concentraciones de cada herbicida presentó diferentes perfiles de consumo por tipo de sustrato. Si bien disminuyeron los consumos de aminoácidos y vitaminas en las muestras A1 y A2, en la muestra A3 aumentaron nuevamente presentando un consumo mayor respecto al control. Cabe destacar que todos los índices analizados permitieron comprobar una alta homogeneidad entre las comunidades bacterianas control y tratadas. Por otro lado, si bien D1 presentó un perfil de sustratos consumidos muy similar al del control, la muestra D2 mostró proporciones de consumo diferentes como mayor consumo de carbohidratos y menor consumo de ácidos orgánicos. En el caso de la muestra D3, se obtuvieron menores proporciones de consumo de sustratos, aunque los índices de diversidad metabólica y el número de sustratos consumidos fue mayor respecto al control. Los demás parámetros analizado como el índice de Dominancia, Equitatividad y Similitud permitieron comprobar que las muestras tratadas con 2,4-D presentaron características muy homogéneas entre si. En conjunto los resultados de este ensayo sugerirían que las comunidades bacterianas extraídas en primavera presentarían una mayor tolerancia tanto a atrazina como a 2,4-D.

- **Capacidad de Biodegradación de las comunidades bacterianas**

En este trabajo se pudo comprobar la biodegradación de 2,4-D en las muestras extraídas en verano y primavera de agua superficial del embalse Los Molinos. Esto sugeriría que para la remoción de este compuesto se requiere la participación concertada de la comunidad bacteriana. Otros autores han hallado consorcios que pueden degradar el compuesto, en particular de suelos contaminados con el 2,4-D (Vieublé Gonod *et al.*, 2006; Zabaloy *et al.*, 2010). Tal como se observó en los ensayos de tolerancia, en las muestras extraídas en primavera se verificó un incremento de las bacterias heterótrofas cultivables respecto de las bacterias totales alcanzando un porcentaje de 24% (Figura 4-4). Es posible que el agregado de nutrientes al medio haya facilitado la adaptación de esas poblaciones de bacterias heterótrofas a que puedan utilizar el 2,4-D como fuente de carbono, obteniendo luego de los primeros 28 días una disminución de 10% la concentración de 2,4-D (20 mg/L) .

En las muestras de verano como de primavera, se obtuvo una remoción del 85 y 78% luego de 77 días de incubación.

La tasa de biodegradación de un compuesto orgánico en un ambiente natural o en ensayos controlados de laboratorio puede ser afectada por una multiplicidad de factores, incluyendo la adaptación de los microorganismos a la presencia de ese compuesto. La adaptación a un compuesto se define como un incremento de la capacidad de una cepa bacteriana o comunidad microbiana para degradar un compuesto luego de haber sido expuesto al mismo por un periodo prolongado. El proceso de adaptación es el resultado de una serie de mecanismos moleculares, genéticos y poblacionales que se manifiestan en un cambio en la dinámica, estructura y función de la comunidad microbiana. Esto incluye la inducción o desrepresión de enzimas, cambios genéticos, y la selección y crecimiento de aquellas cepas que presentan la capacidad de biodegradar el compuesto (Arbeli y Fuentes, 2007). Para poder obtener altas eficiencias de remoción de los compuestos presentes en el medio, se requiere de un periodo de adaptación para que las bacterias seleccionadas o las comunidades bacterianas expresen la maquinaria metabólica necesaria para poder utilizar al compuesto como fuente de carbono (Singh y Walker, 2006).

Bajo las condiciones de ensayo no pudo confirmarse la degradación de atrazina en ninguna de las muestras estacionales. La degradación biológica de la atrazina depende de

varios factores como la disponibilidad de fuentes de carbono y nitrógeno, la relación entre carbono y nitrógeno (C/N) y los microorganismos presentes involucrados en el proceso (Abigail y Das, 2012). Varios trabajos destacan la alta persistencia de este compuesto con velocidades de mineralización muy bajas (Graymore *et al.*, 2001; Tappe *et al.*, 2002; Sene *et al.*, 2010). Diversos autores han señalado que la degradación de atrazina se ve inhibida por la presencia de otros compuestos de nitrógeno en el medio de cultivo, ofreciendo a las bacterias fuentes alternativas de mayor disponibilidad biológica (Mandelbaum *et al.*, 1995; Radosevich *et al.*, 1995). La baja solubilidad del compuesto en agua también afecta la eficiencia de los procesos de biodegradación tal como fue señalado en varios trabajos (Mata-Sandoval *et al.*, 2000; Komang Ralebitso *et al.*, 2002; Sene *et al.*, 2010). Es por eso que algunos investigadores han propuesto el uso de surfactantes con el fin de aumentar la solubilidad de la atrazina y así facilitar los procesos de remoción en suelos contaminados (Mata-Sandoval *et al.*, 2000).

La atrazina es un contaminante ambiental de gran relevancia debido a que presenta una muy baja biodegradabilidad y tiene una capacidad alta de contaminar los cursos de agua superficial y subterránea (Sene *et al.*, 2010; Pathak y Dikshit, 2011). En base al valor máximo para protección de la vida acuática establecido por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, 2005) para la atrazina, el cual debe hallarse en concentraciones menores a 3 µg/L, el hecho de no hallar bacterias en el embalse Los Molinos que degraden este compuesto y que aseguren su eliminación, sugiere que a medida que se mantenga o se incremente la utilización de este compuesto, éste se ira acumulando en el ambiente incrementando progresivamente los riesgos para al salud de la población y la integridad del ecosistema.

6- CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos y el análisis de los ensayos de tolerancia a atrazina y a 2,4-D y de los de biodegradación se puede concluir lo siguiente:

⊙ El análisis de muestras de agua provenientes del embalse Los Molinos adicionadas con concentraciones crecientes de atrazina y 2,4-D permitió comprobar que las comunidades bacterianas naturales presentaron capacidades de respuesta diferentes según la concentración de cada compuesto y la estación del año. En este sentido, se destaca que las comunidades mostraron ser más homogéneas y tolerantes a los herbicidas en las muestras extraídas en primavera, mientras que en otoño e invierno fueron más vulnerables.

⊙ Los recuentos de bacterias heterótrofas cultivables (BHC) de las muestras tratadas con atrazina al finalizar el ensayo de tolerancia respecto a cada control no mostraron diferencias en los valores obtenidos; aunque sí pudo observarse un cambio en el tipo de colonias que proliferaron en placa de Petri, destacándose los cambios en la dominancia hacia unas pocas colonias en las muestras tratadas respecto al control. Esta observación señalaría una mayor adaptación al compuesto de algunas poblaciones de bacterias heterótrofas respecto de otras. En las muestras expuestas a la mayor concentración (A3) provenientes de los ensayos correspondientes a verano y otoño al finalizar el ensayo de tolerancia se obtuvieron menores recuentos en placa de Petri respecto a cada control, pero manifestando el mismo comportamiento sobre la diversidad bacteriana.

⊙ Al comparar los recuentos en placa de Petri con y sin agregado de atrazina en los ensayos correspondientes a otoño e invierno fue posible distinguir las bacterias heterótrofas tolerantes (BHtol) de las bacterias heterótrofas cultivables viables totales (BHC) destacando que la capacidad de sobrevivir en un medio con atrazina no necesariamente está relacionada con la capacidad de crecer y proliferar para formar colonias en presencia de ese compuesto. Este resultado podría señalar diferentes estrategias metabólicas de las bacterias frente a un compuesto potencialmente tóxico.

⊙ El número de bacterias totales (BT) de las muestras tratadas con atrazina no mostraron diferencias estadísticas con los recuentos de los controles, aunque sí permitieron calcular la relación de BHC/BT para comparar el crecimiento de las bacterias heterótrofas cultivables respecto de las bacterias totales. El resultado más destacado tiene que ver con el hecho de hallar que este porcentaje en las muestras tratadas del ensayo de primavera fueron superiores al porcentaje determinado en el control, revelando que, la atrazina presentaría un efecto adverso sobre algunas poblaciones bacterianas a favor del crecimiento del grupo heterótrofo, ya que se obtuvo una disminución del número de bacterias totales (BT) aunque no significativa. Esto podría interpretarse que las poblaciones de bacterias heterótrofas mostraron una mayor capacidad de tolerar la atrazina, probablemente debido a que presentaron una mayor biomasa, o bien por estar constituida la comunidad por especies más tolerantes. En los citogramas correspondientes a los ensayos de primavera (Figura III.3 del ANEXO 3), se observa un marcación compacta y homogénea relacionada a las bacterias “Vivas activas” posiblemente debido a que, como se mencionó antes, dominan unos pocos grupos.

⊙ En las muestras de agua tratadas con dosis crecientes de 2,4-D, las bacterias heterótrofas cultivables (BHC) mostraron ser mucho más susceptibles a este compuesto, ya que se obtuvieron menores recuentos a mayor concentración del mismo respecto al control. Este efecto inhibitorio de la capacidad de crecer en placa se registró dentro de la primera hora de incubación para todas las muestras tratadas. Si bien a lo largo del ensayo de tolerancia se registró un incremento en los recuentos de BHC, este número siempre fue significativamente menor respecto al control. La relación entre BHC y BT reveló que las bacterias heterótrofas presentaron un menor crecimiento respecto a las bacterias totales, siendo este efecto dependiente de la concentración del compuesto y mucho más marcado en las muestras de otoño e invierno.

⊙ Mediante el empleo de la citometría de flujo se comprobó que las comunidades bacterianas tolerantes presentaron diferencias en la proporción de bacterias agrupadas dentro de las categorías “Muertas”, “Injuriadas”, “Vivas-activas” y “Vivas- no activas” en las diversas estaciones del año. Para todas las muestras estacionales se halló que las categorías de bacterias “Muertas” e

“Injuriadas” aumentaron en las muestras expuestas a 2,4-D, así como en las muestras que fueron expuestas a la concentración más alta de atrazina (A3). Las muestras que presentaron menor proporción de mortalidad correspondieron a las de primavera. Se observó además que los valores proporcionales de cada categoría fueron similares entre las muestras tratadas y su control. Esto señalaría que en esta estación de primavera la comunidad bacteriana no sufriría efectos adversos significativos por la exposición a atrazina y a 2,4-D.

⊙ Del análisis de DGGE surge que los cambios en las estructuras de las comunidades bacterianas fueron diferentes al ser expuestas a atrazina o a 2,4-D. Las muestras tratadas con las concentraciones baja e intermedia de atrazina (A1 y A2) mostraron una mayor similitud en todas las estaciones, mientras que la expuesta a dosis más alta (A3) mostró una composición genética marcadamente diferente respecto al control y a las otras dos muestras tratadas.

Las muestras tratadas con 2,4-D presentaron cambios más drásticos en la composición genética. En las muestras de verano, otoño e invierno, al incrementar la concentración aumentó también la detección de filotipos en el perfil de bandas, lo cual si bien se reflejó en valores más altos del índice de diversidad, esto fue coincidente con los menores recuentos de bacterias heterótrofas cultivables (BHC). Este resultado podría deberse a que al disminuir el número de bacterias en las muestras tratadas, disminuyen las especies dominantes, pudiendo detectarse especies raras y/o de baja abundancia en la población, lo que se manifiesta como un incremento aparente de la biodiversidad.

En la estación de primavera, se obtuvo en general una mayor similitud entre los perfiles de bandas de las muestras tratadas con ambos herbicidas respecto al control, lo que sugeriría una comunidad bacteriana tolerante más estable a los efectos potencialmente adversos de ambos herbicidas.

⊙ De la comparación de los perfiles de consumo de fuentes de carbono de las comunidades bacterianas expuestas a los diferentes tratamientos con herbicidas se concluyó que los sustratos consumidos por las comunidades bacterianas fueron diferentes según hayan sido tratadas con atrazina o con 2,4-D. En lo referente a 2,4-D, las muestras tratadas mostraron una disminución del consumo total, expresado en términos de RMP, y del número de sustratos consumidos a medida que se

incrementó la concentración. Esta preferencia de unos pocos sustratos respecto de otros, lo confirmó el aumento del valor del índice de Dominancia, así como la disminución del índice de Equitatividad que demostró que el consumo de los sustratos fue heterogéneo. La concurrencia de ambos resultados pone en evidencia que sólo unos pocos sustratos son consumidos y lo son con mayor intensidad. Más aún, la disminución del consumo de fuentes de carbono fue más notoria en las comunidades bacterianas provenientes de muestras de las estaciones de otoño e invierno. Esto concuerda con el hecho de haber hallado recuentos de bacterias heterótrofas cultivables más bajos durante las estaciones invernales. Es decir que hay menos grupos bacterianos que utilizan fuentes carbonadas como sustrato de crecimiento y que ello se evidencia partir de las bajas tasas metabólicas de los mismos.

Contrariamente, las diferencias en los perfiles de consumo de las muestras tratadas con ambos herbicidas de las estaciones de verano y primavera fueron más homogéneas. En el caso de la atrazina los diferentes tratamientos no fueron concluyentes ya que los comportamientos presentaron fluctuaciones en las diferentes estaciones del año y entre las diversas concentraciones de compuesto, aunque también se observó una tendencia a incrementar los valores de los índices de diversidad. Esto podría deberse a las variaciones estacionales de las composiciones específicas de las comunidades bacterianas.

● La implementación del análisis de componentes principales para la evaluación de los perfiles de fuentes de carbono reveló que las comunidades bacterianas consumieron diferentes compuestos dentro de cada tipo de fuente de sustratos (aminoácidos, ácidos orgánicos, carbohidratos, polímeros - compuestos aromáticos y vitaminas) lo que implica diferentes respuestas metabólicas en las distintas estaciones del año, a pesar que el consumo neto en cada tipo fuera similar. Esto podría señalar que las comunidades bacterianas en diferentes momentos del año presentan composiciones específicas con requerimientos nutricionales.

● Se observó que las comunidades bacterianas presentes en muestras de agua superficial del embalse Los Molinos tomadas en las estaciones de verano y de primavera, degradaron el 85 y el 78% de una concentración de 20 mg/L del 2,4-D adicionada a las muestras. Así también, en las muestras extraídas en otoño se

obtuvo una remoción de 30%. Estos resultados se obtuvieron luego de 77 días de incubación bajo condiciones controladas de laboratorio. Esto comprueba la existencia de bacterias del ambiente capaces de remover el compuesto. Cabe señalar que en ninguno de los ensayos realizados se obtuvo una completa mineralización.

Bajo las mismas condiciones de ensayo no se comprobó la existencia de bacterias tolerantes aisladas con capacidad de degradar la atrazina. Bajo las condiciones de ensayo no pudo comprobarse que las bacterias tolerantes presentaran capacidad de degradar los compuestos en estudio.

En resumen, cabe destacar que la aplicación de métodos moleculares en conjunto con estudios fisiológicos y bioquímicos, han permitido avanzar en la comprensión de la estructura y dinámica de comunidades bacterianas complejas provenientes de ambientes naturales y su participación en los procesos de regulación de ecosistemas impactados con herbicidas.

Finalmente se destaca que para cumplir los objetivos de la tesis surgió la necesidad de complementar el trabajo implementando la modelación de la dispersión de pesticidas y el análisis de los parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos para la evaluación de la calidad del agua del embalse los cuales que se presentan en el ANEXO I.

Como conclusión del empleo de la modelación con SoilFug se puede señalar que:

- Permitió estimar las concentraciones y describir los comportamientos de la atrazina y el 2,4-D en las diferentes matrices ambientales en dos escenarios teóricos de dispersión realizados en base a la información de las fichas fitosanitarias, el nivel de precipitaciones y a las características del suelo en la zona considerada en el estudio. Se tomó como escenario de mínima dispersión una aplicación única de herbicida en una parcela individual de 100 ha que representa el promedio de las parcelas habitualmente cultivadas con maíz y soja. El segundo escenario estima la dispersión contemplando la cobertura máxima cultivada en la subcuenca del río Los Reartes que para maíz (que utiliza atrazina) es de 3000 ha y para soja (que utiliza 2,4-D) es de 5000 ha. Estas simulaciones representan el escenario de menor y de mayor impacto debido a la aplicación simultánea de cada herbicida. En particular se

comprobó que ambos podrían estar presentes en las aguas de escorrentía de la cuenca agrícola circundante al embalse Los Molinos, aunque en el caso del 2,4-D podría hallarse en concentraciones inferiores a las que las técnicas empleadas en este trabajo permiten detectar. En apoyo a lo expuesto por Brock y col. (2006), la no detección no implica que no se encuentre el pesticida en el ambiente, lo cual puede deberse fundamentalmente a la sensibilidad de las técnicas empleadas, la elección inadecuada del momento del monitoreo, entre otros.

Cabe destacar que la detección de la atrazina en muestras extraídas del río Los Reartes en concentraciones que se hallaron dentro del rango estimado por el modelo permitió su validación, mientras que la no detección del 2,4-D resulta consistente con los niveles estimados por dicho modelo (Ver ANEXO I).

⊙ Además, en función del modelo la atrazina permanece tanto en suelo como en agua por varios meses con una baja tasa de degradación mientras que el 2,4-D decae rápidamente en suelo y en agua. Así, la atrazina decae a la mitad de su concentración inicial luego de 60 días (equivalente a 10 eventos de lluvias-Figura I.4-ANEXO I), posteriores a su aplicación, mientras que el 2,4-D decae a la mitad de su concentración luego de una semana luego de ser aplicado en campo (equivalente a dos eventos de lluvias (Figura I.5-ANEXO I).

Respecto del análisis de la calidad y estado sanitario del agua se obtuvo que:

⊙ El embalse Los Molinos presenta una condición eutrófica y se demostró que esta situación de deterioro es más marcada en las zonas del perilago, mientras que en el centro e incluso en la zona de la presa aún puede determinarse condiciones mesotróficas. Por otra parte, el deterioro es más notorio durante la estación de verano.

⊙ En relación con la calidad sanitaria del agua se pudo comprobar mediante la cuantificación de bacterias indicadoras específicas, que los valores determinados se encontraron por debajo de los valores límites del nivel guía estipulados por la Secretaria de Recursos Hídricos de la Nación (SRHN, 2005). De todas maneras, se detectaron eventos esporádicos donde fueron efectivamente superados estos valores y no resultó apta para uso recreacional debido a la contaminación fecal, en

especial en la desembocadura del río Los Reartes (DLR) durante los meses de verano y primavera.

⊙ Estos eventos de mayor contaminación pudieron ser evaluados a través de la detección de las bacterias estreptococos fecales y enterococos en conjunto con *E. coli*. En la actualidad existe una tendencia creciente a usar estos dos últimos indicadores en forma combinada, por ser los más adecuados para determinar la calidad del agua ya que su concentración en el ambiente se correlaciona mejor con la incidencia de enfermedades de origen hídrico. En virtud de estos resultados se destaca las ventajas de incorporar estas determinaciones para desarrollar niveles guía de calidad sanitaria más adecuados a la región.

7- CONSIDERACIONES FINALES Y RECOMENDACIONES

Debido a la importancia del embalse Los Molinos en tanto constituye uno de las principales fuentes de agua potable de la Provincia de Córdoba y que el mismo se encuentra bajo un progresivo proceso de contaminación, urge la implementación de medidas tendientes a disminuir su deterioro producto de los diversos factores de contaminación que comprometen su calidad, tales como los provenientes de la actividad agrícola y de las descargas de efluentes domésticos y cloacales de los asentamientos urbanos en la zona.

A pesar que esta cuenca se encuentra bajo un programa de protección de suelo y conservación de los recursos hídricos, la intensificación de la actividad agrícola conlleva a un progresivo incremento en el uso de agroquímicos lo que torna más importante su evaluación.

En este estudio se abordó el análisis de las comunidades bacterianas debido a su participación en los procesos de autodepuración del agua y su rol central en el mantenimiento del equilibrio del ecosistema acuático. Es por ello que se evaluaron las respuestas de las comunidades bacterianas presentes en el agua de este embalse, expuestas a dos de los herbicidas de mayor aplicación en la zona aledaña.

Cada una de las diversas técnicas y metodologías aplicadas a la evaluación de las comunidades bacterianas (métodos moleculares en conjunto con estudios fisiológicos y bioquímicos para evaluar la viabilidad, la estructura y la función de las comunidades bacterianas) presentó sus propias ventajas y limitaciones, pero del uso complementario de todas ellas permitió una descripción más completa del sistema.

Cabe destacar que este trabajo es el primero que realiza este tipo de abordaje referido a las aguas del embalse Los Molinos.

Es indudable que las comunidades bacterianas en ambientes naturales constituyen sistemas complejos y altamente variables en el tiempo y en el espacio, y por tanto resulta importante aplicar en conjunto diversas técnicas de evaluación para lograr una mejor comprensión del funcionamiento del ecosistema acuático.

Es por ello que este trabajo puntualiza la conveniencia de incorporar estudios sobre comunidades bacterianas en los planes de gestión de los recursos hídricos a fin de contar con datos para establecer su participación en los procesos de depuración de agua, así como en estudios ecotoxicológicos destinados a predecir y estimar riesgos como los generados por la presencia de tóxicos ambientales

El empleo de modelos de dispersión de pesticidas como el SoilFug (Ver ANEXO I) ha demostrado ser de gran utilidad para establecer marcos de referencia en relación con el comportamiento de los pesticidas en el ambiente y de su utilidad para el análisis de riesgo. Por esto es que se sugiere la conveniencia de incorporar en forma sistemática su empleo señalando además las ventajas que representa contar con esta información para optimizar los planes de monitoreo al indicar el momento más oportuno para la toma de muestra, lo que a su vez permite disponer mas eficientemente de los recursos económicos, técnicos y humanos disponibles, así como anticipar, y por ende minimizar, los impactos adversos en el ecosistema acuático.

La tendencia actual en gestión y manejo de los recursos naturales es a una visión más “ecológica” que integra no sólo una valorización económica del recurso natural sino también los servicios directos e indirectos que provee el ambiente. En especial los recursos hídricos requieren un manejo integrado que contemple todos los aspectos relacionadas con el sistema.

Los ecosistemas de agua dulce funcionalmente intactos y biológicamente complejos proveen muchas materias primas de valor económico y muchos servicios a la sociedad. Estos servicios incluyen control de las inundaciones, transporte, recreación, remoción de efluentes industriales y domésticos, hábitat para plantas y animales, producción de alimentos como peces. La conservación de los ecosistemas acuáticos es sustancial para asegurar a largo plazo la producción de esos bienes y servicios, en especial considerando las alteraciones ambientales futuras, tales como el cambio climático.

RESUMEN

El propósito de este trabajo es estudiar el impacto que ejerce la presencia de los herbicidas atrazina y 2,4-D sobre las comunidades bacterianas presentes en muestras de aguas del embalse Los Molinos el cual representa la segunda fuente de agua potable de la ciudad de Córdoba. Debido al constante crecimiento de la actividad agropecuaria en la cuenca la calidad de las aguas del embalse se ve comprometida debido al arrastre superficial de agroquímicos. Se ha registrado en la zona un incremento en el empleo de herbicidas como la atrazina y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

Para evaluar la tolerancia de la comunidad bacteriana a atrazina y 2,4-D, se expusieron muestras de agua superficial del embalse Los Molinos a 0,02; 0,20 y 2 mg/L de atrazina, y a 2; 20; 200 mg/L de 2,4-D durante 5 días. Se determinaron los cambios en el número de bacterias totales (BT), cultivables heterotróficas (BHC) y tolerantes a los herbicidas (Btol) mediante microscopía de epifluorescencia y recuentos en placa de Petri con agar R2A al inicio y al final del ensayo de exposición a los herbicidas. Se utilizó la citometría de flujo con el fin de determinar niveles de viabilidad/mortalidad de las bacterias. Asimismo, se determinaron los cambios en la estructura y la función de las comunidades bacterianas mediante la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturante (PCR-DGGE) y el análisis metabólico de la comunidad (CLPP) el cual se basa en el perfil de utilización de fuentes de carbono.

Solo se obtuvieron diferencias significativas en los recuentos de BHC al final del ensayo de tolerancia para la muestra expuesta a la mayor concentración de atrazina respecto al control. No se observaron diferencias entre los recuentos de BT al final del ensayo. Sin embargo, la exposición a dosis crecientes de 2,4-D (2, 20 y 200 mg/L) inhibió significativamente (ANOVA, $P < 0,05$) el crecimiento bacteriano. Las comunidades bacterianas expuestas a atrazina o 2,4-D exhibieron diferentes perfiles de consumo de fuentes de carbono. En general se obtuvo un incremento en la diversidad funcional en los grupos tratados con concentraciones crecientes de atrazina. Por otro lado, el número de fuentes de carbono utilizadas y la diversidad funcional disminuyó respecto al control a medida que se incrementó la concentración de 2,4-D.

La exposición a atrazina disminuyó la complejidad de la comunidad bacteriana, ya que el número de filotipos en el DGGE disminuyó a medida que se incrementó la concentración. Contrariamente, en los DGGE de las muestras expuestas a 2,4-D se reveló

una mayor diversidad genética, aunque coincidente con los menores recuentos bacterianos. Sin embargo los grupos tratados con las concentraciones más altas de los herbicidas, mostraron una baja similitud respecto de los demás grupos, indicando un importante cambio en la composición genética de las comunidades bacterianas.

Estos resultados indican que la exposición a 2,4-D inhibe el crecimiento bacteriano y modifica la estructura de la comunidad bacteriana de manera que se evidencia una pérdida de la biodiversidad funcional. La atrazina mostró tener un efecto moderado a dosis baja e intermedia.

Finalmente, sólo se verificó la degradación de 2,4-D en muestras tomadas en primavera, verano e invierno expuestas a 20 mg/L, con una eficiencia de remoción del 87, 74 y 30% respectivamente.

Se concluye que, bajo las condiciones de incubación en laboratorio, la respuesta de las comunidades bacterianas difiere en las distintas estaciones del año, tanto en su composición específica como en sensibilidad a los herbicidas, hallando que las bacterias de las muestras provenientes de las estaciones de otoño e invierno fueron más vulnerables, especialmente en aquellas tratadas con 2,4-D.

Complementariamente, por un lado se implementó el modelo de dispersión de pesticidas SoilFug para estimar concentraciones de atrazina y de 2,4-D en el agua de escorrentía de la cuenca del embalse. Tomando como referencia las dosis declaradas de los herbicidas aplicados en campo y considerando una extensión de área cultivada entre 100 a 3000 ha se estimó que la atrazina podría detectarse en un rango de 2,25 a 67,5 µg/L con una vida media de 60 días. Respecto del 2,4-D, considerando una extensión de cultivo de 100 a 5000 ha, las concentraciones estimadas se hallarían entre 0,53 y 26,2 µg/L, con una vida media aproximada de 10 días. Por el otro lado se realizó una caracterización de la calidad del agua del embalse comprobando que las condiciones eutróficas predominaron a lo largo del año.

Este trabajo pone en evidencia la necesidad de incorporar estudios de microbiología ambiental para la evaluación integral de la calidad del agua y de los mecanismos involucrados en la depuración de aguas contaminadas.

ANEXO I. ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS

MODELACIÓN DE LA DISPERSIÓN DE ATRAZINA Y 2,4-D EN LA CUENCA DEL EMBALSE LOS MOLINOS

I.1- INTRODUCCION

Como se mencionó previamente la actividad agrícola en la cuenca del embalse Los Molinos se localiza fundamentalmente en la zona sur abarcando la subcuenca del río Los Reartes. Sin embargo, se desconocen las concentraciones de pesticidas que pueden llegar a las aguas del embalse. Debido a que el monitoreo frecuente de estos compuestos puede llegar a ser muy costoso, es que se ha propuesto implementar modelos de dispersión de pesticidas con el fin de contar con valores de referencia de concentraciones en el suelo, en el agua y en el aire, de aquellos compuestos más utilizados en la zona. De manera complementaria se presenta los resultados del modelo de dispersión SoilFug con el fin de predecir las concentraciones de atrazina y 2,4-D en el agua de escorrentía que llega al embalse, y así poder estimar su impacto. Se discute además las ventajas de la implementación de estos modelos en los monitoreos de calidad de aguas.

I.2- MATERIALES Y MÉTODOS

I.2.1 Relevamiento local del consumo y uso de los pesticidas

Con el fin de recopilar información sobre uso y manejo de pesticidas en la zona circundante con mayor actividad agrícola localizada en el perilago del embalse Los Molinos, se recolectaron las fichas fitosanitarias que fueron provistas por la Comuna de la Villa Ciudad Parque Los Reartes. En base a la información de las fichas se evaluaron los siguientes aspectos: Tipo de cultivo, superficie, época de siembra, los pesticidas de mayor consumo en la zona afectada del perilago, dosis, número y frecuencia de las aplicaciones. A modo ilustrativo se adjuntan al final del ANEXO I dos modelos de fichas fitosanitarias (Figuras I.6.3)

I.2.2 Escenarios de simulación del modelo SoilFug

Los parámetros que el modelo SoilFug utiliza están basados en las condiciones locales agrícolas, climáticas y en la cantidad de aplicaciones de pesticidas. La aplicación del modelo permite obtener una evolución temporal del comportamiento del herbicida

tanto en suelo como en el agua drenada (que incluye el escurrimiento superficial, subsuperficial y el percolado) y las masas molares de cada herbicida removidas a través de los procesos de escurrimiento (*runoff*), degradación (*degradation*) y volatilización (*volatilization*). La escala temporal de estos gráficos está representada por el número de eventos de lluvias. En este trabajo se consideraron 20 eventos de lluvias para la modelación tanto de atrazina como de 2,4-D.

En base a la información provista por el personal de la Comuna de Villa Parque Los Reartes, se pudo estimar que la actividad agrícola localizada en la subcuenca del río Los Reartes en la cuenca del embalse Los Molinos alcanza una cobertura máxima en primavera de alrededor de 5000 ha cultivadas. Dependiendo de la época del año, entre 60 y 100% corresponde a soja, mientras que en invierno donde predomina el maíz, la cobertura de siembra abarca entre 40 y 60%.

En base a estos datos y con el objetivo de estimar cuánto pesticida es drenado en las aguas de escorrentía correspondiente a la zona cultivada, se realizó la simulación para dos escenarios diferentes, que se definen en este Trabajo de Tesis como:

- **Escenario 1:** considera una aplicación única de herbicida en una parcela cultivada individual con dimensiones promedio de 100 ha.
- **Escenario 2:** estima la dispersión de cada herbicida en estudio contemplando la cobertura máxima cultivada en la subcuenca del río Los Reartes de 5000 ha. Esta simulación pretende representar el escenario de mayor impacto debido a la aplicación simultánea de cada herbicida.

Los datos que se utilizaron para la estimación de la distribución de masas y concentraciones de los herbicidas en estudio correspondieron a la temporada 2008-2011.

▪ **Registro de las precipitaciones**

De acuerdo a la información facilitada por el Servicio Meteorológico Nacional (SMN), se obtuvieron las precipitaciones diarias, mensuales y anuales correspondientes a la estación Meteorológica de "Córdoba Observatorio". En la Figura I-1 se muestran las curvas correspondientes a las precipitaciones acumuladas (mm) mensuales de los años 2008 a 2011.

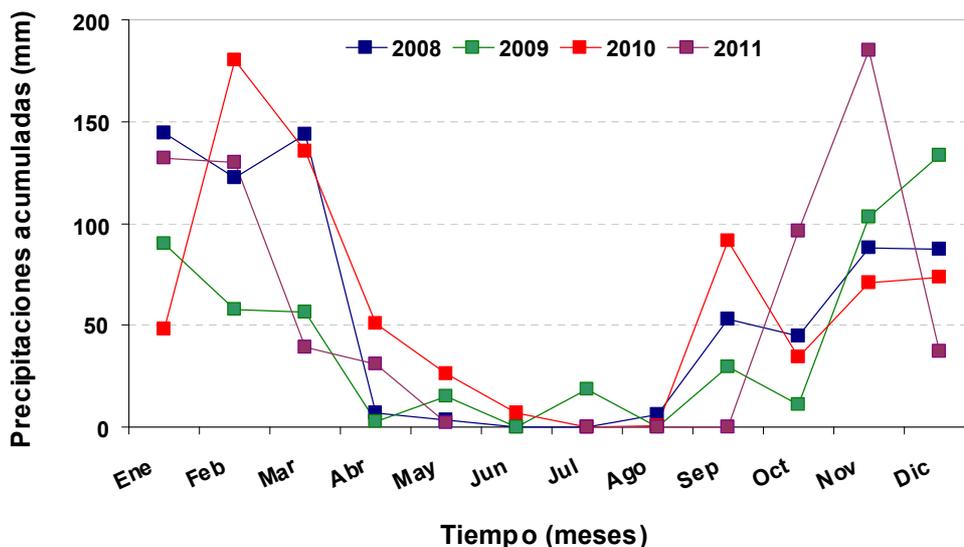


Figura I-1. Pluviométrica acumulada (mm) para los años 2008 a 2011. Datos registrados en la Estación meteorológica: Córdoba observatorio

▪ **Condiciones ambientales y agrícolas usadas en las simulaciones**

Las condiciones ambientales y agrícolas de la cuenca del embalse Los Molinos fueron caracterizados conforme a los siguientes aspectos: 1) propiedades de los herbicidas a estudiar, 2) Propiedades del suelo (temperatura, profundidad, fracciones volumétricas de aire y agua, fracción de carbono orgánico), 3) Información meteorológica (registro de lluvias) y 4) Balance de agua (coeficiente de escorrentía superficial).

De esta manera los datos requeridos por el modelo son los siguientes:

1) Pesticidas en estudio: Atrazina y 2,4-D

Las propiedades de la Atrazina y del 2,4-D que requiere el modelo SoilFug se presentan en la Tabla I-1 expresados en función de las unidades que requiere el modelo.

Tabla I-1. Propiedades de la atrazina y el 2,4-D.

PROPIEDADES FISICOQUIMICAS	ATRAZINA	2,4-D
Peso molecular (g/mol)	215,7	221
Solubilidad en agua (g/L)	0,033	0,9
Presión de Vapor (Pa)	$4,0 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-5}$
Log del Coeficiente de partición octanol-agua (Log Kow)	2,5	2,81
Coeficiente de partición carbono orgánico (Koc)*	103	20 (*)
Tiempo de vida media en suelo (días)	60	15

*Para los herbicidas fenoxiacéticos se utiliza un valor de Koc=20 (Di Giorgio *et al.*, 1994)

2) Las características del suelo que se utilizaron en las simulaciones fueron:

Temperatura del suelo: 20 °C

Profundidad: 30 cm

Fracción volumétrica de aire: 25%

Fracción volumétrica de agua (humedad en suelo): promedio 20 %

Fracción de carbono orgánico: 1,8 %

Área de la cuenca cultivada: 5000 ha localizadas en la subcuenca del río Los Reartes donde se concentra la actividad agrícola.

Los datos relacionados a las características del suelo de la zona donde se encuentra el embalse Los Molinos se han extraído de diversas publicaciones (Aoki y Sereno, 2006; Cantú *et al.*, 2007; Hang *et al.*, 2007; Domínguez *et al.*, 2009)

3) Los registros de precipitaciones que se presentaron en la Figura I-1 se adaptaron para ser ingresados al modelo. Los parámetros que utiliza el modelo son: (a) Número de días antes del evento de lluvia, (b) Número de días consecutivos de lluvias, (c) Cantidad de lluvia caída (mm) y (d) Pérdida de agua por escorrentía.

El coeficiente de escorrentía (CE) representa la fracción de agua del total de las precipitaciones que genera escorrentía superficial una vez que se ha saturado la porosidad del suelo por completo. Su valor depende de la pendiente del terreno. En este trabajo se aplicaron dos métodos para la estimación del cálculo del coeficiente de escorrentía (CE) para la cuenca del embalse Los Molinos. En base al método de Prevert (1986), que considera la textura del suelo además de su uso y tipo de cobertura vegetal, y el método Nadal (1986), que contempla las lluvias medias anuales, la extensión y relieve de la cuenca. De esta manera, teniendo en consideración que la zona del perillago presenta un suelo franco-limoso con un relieve moderado que varía entre 1 a 3%, los valores calculados para el CE oscilaron entre 0,2 a 0,5. Por tanto se, consideró para la modelación un valor promedio del coeficiente de escorrentía típico de 0,35.

4) Evaluación de la aplicación de atrazina y de 2,4-D:

- En función de la información recopilada por la fichas fitosanitarias se contó con las dosis típicas aplicadas en campo para cada herbicida. Para los dos escenarios de simulación se contemplaron las dosis más baja y más alta para cada herbicida con el objeto de contar con un rango de concentración de compuesto que puedan encontrarse en las aguas de escorrentía una vez arrastrados por las lluvias.

La salida de resultados del modelo da los siguientes parámetros:

- Concentraciones de los herbicidas en suelo y en agua en la cuenca
- Los porcentajes de pérdidas de cada pesticidas por escorrentía luego de los eventos de lluvias

I.3-RESULTADOS

I.3.1 Relevamiento local del consumo y uso de los pesticidas en la cuenca del embalse Los Molinos

La Comuna de Ciudad Parque Los Reartes brindó un total de 56 fichas fitosanitarias de las cuales se pudo extraer información sobre 107 aplicaciones de agroquímicos desde el año 2008 al 2011. Sobre las 107 aplicaciones se determinó el porcentaje correspondiente a cada tipo de agroquímicos utilizados en la cuenca del embalse (Figura I-2).

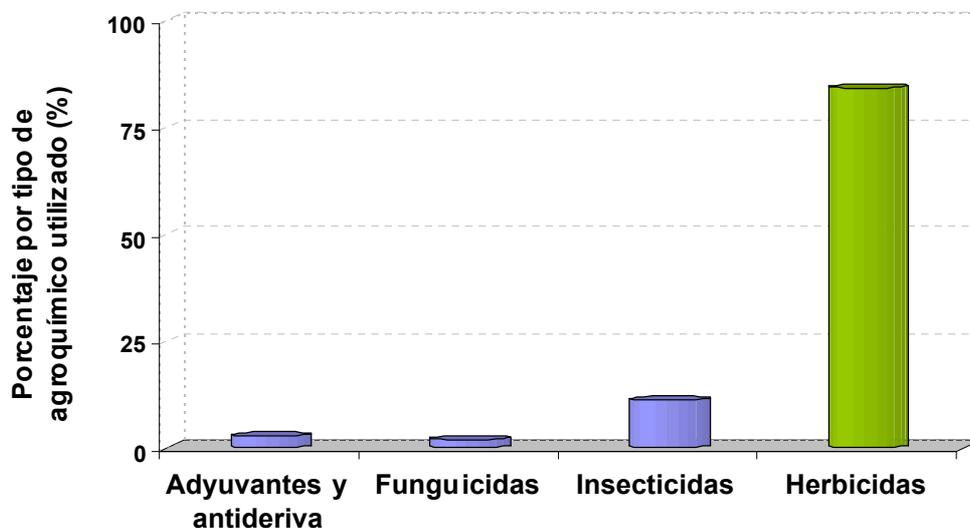


Figura I-2. Porcentajes por tipo de agroquímicos utilizados en la cuenca del embalse Los Molinos considerando 107 aplicaciones (2008-2011).

En cuanto a la clasificación por tipo de uso, se observó que el uso mayoritario es de herbicidas correspondiendo al 84,1% del total de las aplicaciones registradas. Los bajos porcentajes obtenidos de funguicidas e insecticidas (1,8 y 11%, respectivamente) se debe a que los mismos son utilizados esporádicamente y sujeto al tipo de plaga que se

identifique en cada periodo de cultivo. En la Figura I-3 se presentan los herbicidas más utilizados en la subcuenca del río Los Reartes declarados en las fichas fitosanitarias correspondientes a las 107 aplicaciones previamente mencionadas.

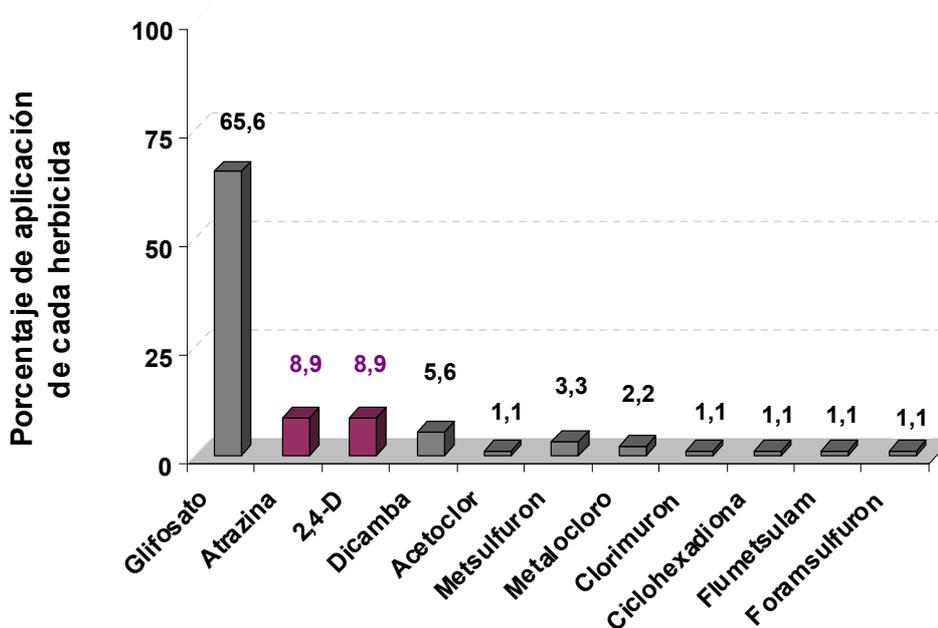


Figura I-3. Porcentaje de los herbicidas más utilizados sobre el total de 107 aplicaciones.

De la información que se presenta en la Figura I-3 se verificó que el herbicida más utilizado es el glifosato, seguido por la atrazina y el 2,4-D. Debido a que los agroquímicos utilizados correspondieron a diferentes marcas comerciales, las dosis utilizadas variaron dependiendo, no sólo del tipo de cultivo sino también de la marca y formulación particular. Sin embargo, en la Tabla I-2 se presenta los cultivos predominantes en la zona con las dosis promedio que se han reportado para cada tipo de cultivo, además de la combinación de herbicidas más utilizados y el periodo de aplicación.

Tabla I-2. Periodos de aplicación, herbicidas utilizados y dosis promedios de los principales cultivos

CULTIVOS	PERIODO	HERBICIDAS UTILIZADOS	DOSIS
Soja	primavera-verano-otoño	Glifosato// 2,4-D	2,5-5 L/ha// 0,6 L/ha
Maiz	otoño-invierno	Atrazina//Dicamba	0,5-3 L/ha// 0,5 L/ ha
Trigo	invierno-primavera	2,4D// Dicamba	2-7 L/ha// 0,18 L/ha
Sorgo	invierno-primavera	2,4D//Atrazina	0,3 L/ha// 0,5 L/ha

De los datos presentados en la Tabla I-2 se aprecia que en la cuenca del río Los Reartes el 2,4-D es utilizado durante todo el año. En las fichas fitosanitarias se corrobora que este compuesto se lo emplea sólo o en combinación con otros agroquímicos tanto en cultivos de soja como de trigo, sorgo e incluso maíz. Se presentan ejemplos de fichas fitosanitarias en el ANEXO II.D. Por otra parte, la atrazina es empleada casi exclusivamente en los cultivos de maíz. Este herbicida se suele aplicar a fines del otoño o principio de invierno, aunque se comprobó en las fichas fitosanitarias que muchas aplicaciones se realizaron a comienzos de primavera en coincidencia con las primeras lluvias que dan inicio al periodo húmedo de la región.

En la Tabla I-3 se presentaron cuatro (4) tipos de aplicaciones individuales de atrazina representativos de 3 años diferentes para el cultivo de maíz, en los cuales a través del tipo de formulación que se emplea se calculó la dosis utilizada del compuesto activo.

Tabla I-3. Aplicaciones de atrazina en la subcuenca del río Los Reartes.

FECHA DE APLICACIÓN	CULTIVO	AREA (ha)	HERBICIDA (Marca)	DOSIS EMPLEADA (L/ha)	DOSIS DE ATRAZINA (Kg c.a./ha)
23/11/2008	maiz	200	Atrazina Atanor 50	3	1,50
03/07/2009	maiz	73	Atrazina Zamba 50 FL	1,5	0,75
13/10/2010	maiz	30	Atrazina 90% (granulos)	0,6	0,54
25/11/2010	maiz	130	Atrazina TRAc 50% susp. concentrada	2,2	1,10

c.a. compuesto activo

En la Tabla I-4 se presentaron seis (6) aplicaciones diferentes del herbicida 2,4-D representativas de 3 años diferentes (2008-2010). Si bien no se determinaron las marcas comerciales del herbicida en las fichas fitosanitarias, sí se puede contar con los datos de los porcentajes del ingrediente activo. De esta manera se calculó el contenido del ácido 2,4-D en las dosis utilizadas.

Tabla I-4. Aplicaciones en campo de 2,4-D en la subcuenca del río Los Reartes

FECHA DE APLICACIÓN	CULTIVO	AREA (ha)	HERBICIDA (Pureza)	DOSIS EMPLEADA (L/ha)	DOSIS DE 2,4-D (Kg c.a./ha)
18/10/2008	soja	100	24D 60%	0,51	0,75
19/10/2008	soja	300	24D 60%	1,42	0,68
30/12/2008	sorgo	90	24D concentrado	0,71	0,64
13/07/2009	maiz	45	24D 93,3%	0,68	0,53
13/10/2010	soja	30	24D 80%	0,34	0,27
10/11/2010	soja	60	24D concentrado	0,852	0,43

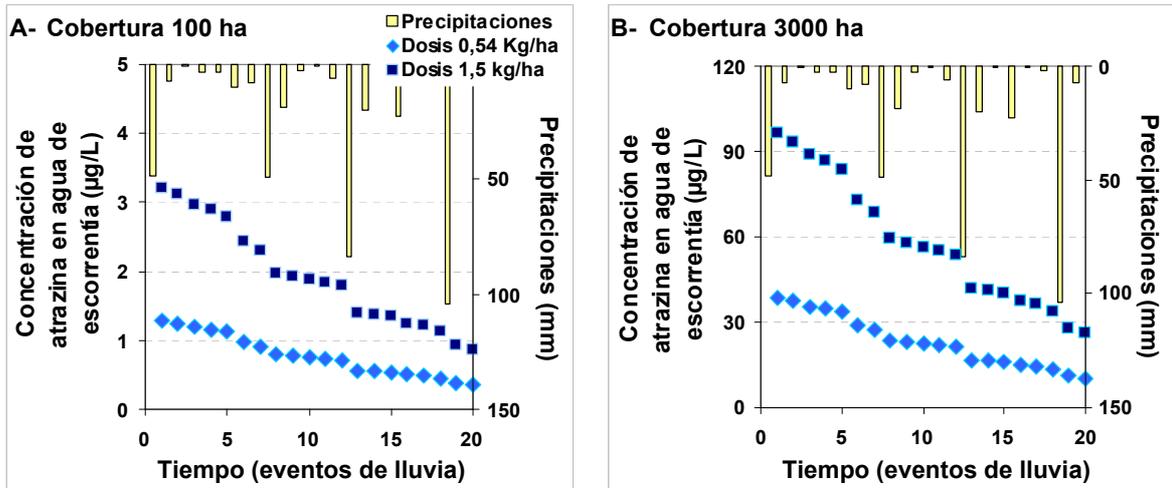
c.a. compuesto activo como ácido 2,4-diclorofenoxiacético

I.3.2 Escenarios de simulación de la dispersión de Atrazina y 2,4-D mediante la modelación SoilFug

Se modelaron dos escenarios para la dispersión de atrazina. El Escenario 1 representa un campo de dimensiones promedio de 100 ha, mientras que el Escenario 2 se modeló la dispersión de la atrazina considerando la cobertura máxima registrada en la zona de 3000 ha que corresponde al 60% de cobertura de maíz en las 5000 ha totales de la subcuenca del río Los Reartes.

Para ambos escenarios se modeló la aplicación de atrazina utilizando la dosis más baja (0,54 Kg/ha) y la más alta (1,5 Kg/ha) declaradas en las fichas fitosanitarias (Tabla I-3). De esta manera se estimó el rango de concentración de atrazina que podría ser detectada en el agua de escorrentía. En la Figura I-4.A-B se presentó las concentraciones esperadas en el agua de escorrentía para los dos escenarios propuestos. La escala temporal se representó como 20 eventos de lluvias, que corresponden a un periodo de 108 días, respecto de la fecha de la aplicación de atrazina (25/11/2010).

Las salidas del modelo SoilFug sobre las que se realizaron los análisis subsiguientes se presentan al final de esta sección como complemento de la modelación del Escenario 1 y 2 para atrazina (Figuras I.6.1-2) y del Escenario 1 y 2 para 2,4-D (Figuras I.6.3-4) para las dosis bajas de herbicida. Dichas salidas graficas presentan la distribución de las concentraciones de atrazina y 2,4-D en suelo, en agua y las principales vías de degradación.



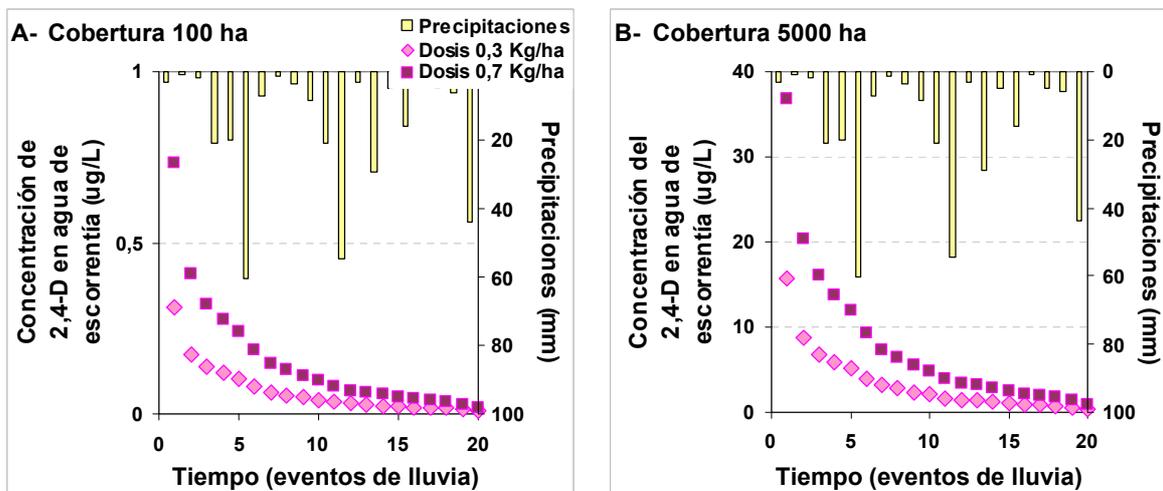
Figuras I-4. Salida de la corrida del modelo SoilFug para atrazina. A) Escenario 1: cultivo de 100 ha utilizando la dosis más baja (0,54 Kg/ha) y la más alta (1,5 Kg/ha). B) Escenario 2: cultivo de 3000 ha utilizando la dosis más baja (0,54 Kg/ha) y la más alta (1,5 Kg/ha).

Como resultado de la modelación de un campo de 100 ha (Escenario 1. Figura I-4.A) se halló que la atrazina podría detectarse en el agua de escorrentía luego del primer evento de lluvia en un rango de concentración entre 1,29 a 3,21 µg/L. Por otro lado, de la modelación, surge que el compuesto decae a la mitad luego de 60 días aproximadamente. Más aún, luego de 108 días, coincidente con 20 eventos de lluvia, la concentración de atrazina podría hallarse en el rango 0,35 a 0,87 µg/L

De la modelación de 3000 ha cultivadas con maíz (Escenario 2. Figura I-4.B), se obtuvo que la atrazina podría detectarse luego de la primera lluvia en un rango de 38,6 a 96,4 µg/L dependiendo de la dosis aplicada. Empleando las mismas condiciones de lluvias y características del suelo, las curvas de decaimiento de la atrazina son iguales independientemente de la concentración. Por ello luego de 108 días podría detectarse un rango de concentración de 10,4 a 26 µg/L.

Para la simulación de la dispersión del 2,4-D en el Escenario 1 se consideró también un campo con una tamaño promedio de 100 ha para un cultivo de soja. Para la simulación del Escenario 2 se modeló la cobertura máxima de 5000 ha. Las modelaciones se realizaron con la concentración mas baja (0,3 Kg/ha) y la más alta (0,7 Kg/ha) declaradas en las fichas fitosanitarias (Figura I-5.A-B). Se consideraron 20 eventos de

lluvias que correspondieron a 115 días consecutivos tomando como día de aplicación el 13/10/2010.



Figuras I-5. Salida de la corrida del modelo SoilFug para 2,4-D. A) Escenario 1: cultivo de 100 ha utilizando la dosis más baja (0,3 Kg/ha) y la más alta (0,7 Kg/ha). B) Escenario 2: cultivo de 5000 ha utilizando la dosis más baja (0,3 Kg/ha) y la más alta (0,7 Kg/ha).

En el caso de la modelación del 2,4-D, bajo la condición del Escenario 1 (Figura I-5.A) la concentración, luego de la primera lluvia, podría hallarse entre 0,3 a 0,74 µg/L dependiendo de la dosis aplicada inicialmente. Para la modelación de la mayor cobertura con 5000 ha cultivadas (Escenario 2 Figura I-5.B) la concentración que podría llegar al agua de escorrentía estaría entre 15,7 y 36,7 µg/L. Como resultado de la modelación se comprobó que este compuesto es muy soluble y decae rápidamente en agua. Es así que luego de aproximadamente 2 eventos lluvias (equivalente a 10 días consecutivos) el 2,4-D decae a la mitad de su concentración inicial.

I.4- DISCUSIÓN

Con el fin de simplificar el empleo del modelo SoilFug, Barra y col. (1995) han propuesto utilizar los datos referentes a una única aplicación como aproximación realista teniendo en consideración el uso habitual de productos fitosanitarios. Es por ello que para este trabajo se optó modelar dos escenarios considerando un evento único de aplicación de herbicidas para una dosis baja y otra alta con el fin de poder contar con un rango probable de presencia del compuesto en el agua de escorrentía.

Como resultado de la modelación se halló que la atrazina y el 2,4-D presentaron características similares en cuanto a las concentraciones que pueden alcanzar en cada

compartimento (suelo y agua). Además, de la aplicación del modelo surge que para ambos herbicidas las pérdidas por volatilización son despreciables; mientras que son los procesos de degradación (fotólisis, hidrólisis y/o biodegradación) las principales vías de decaimiento de estos herbicidas del estrato superior del suelo y el agua (Ver salidas del modelo Figuras I.6 al I.9). Estas características se pueden explicar por sus propiedades fisicoquímicas, así como las condiciones hidrometeorológicas del área, siendo los eventos de lluvia los factores que determinan las concentraciones que pueden hallarse en las aguas de escorrentía.

Diversos autores han señalado el efecto de la estacionalidad de las lluvias, especialmente durante la primavera (Di Guardo *et al.*, 1994; Battaglin y Hay, 1996; Barra *et al.*, 1999; Calamari y Zhang, 2002), en la dispersión de los pesticidas, puntualizando la necesidad de incrementar los monitoreos de aguas superficiales durante este período. Esto podría ser de gran utilidad para el diseño de monitoreos y toma de muestras de pesticidas en las aguas del embalse Los Molinos con el objetivo de maximizar la información obtenida mientras que se minimizan los costos operativos y de medición.

Por otra parte, tal como lo destaca Barra y col. (1999), a la hora de evaluar la dispersión de los pesticidas hay que considerar la cercanía de los cultivos a los cuerpos de agua, ya que aquellos que se encuentran más alejados presentan un mayor porcentaje de pérdidas de los herbicidas por procesos de degradación química, bioquímica y/o lixiviación y en consecuencia la concentración de compuesto que puede ser arrastrado por las aguas de escorrentía es menor.

Respecto del transporte de estos compuestos por lixiviación, son las características del suelo las que afectan la adsorción del herbicida. En este sentido, diversos trabajos (Goss, 1992; Hornsby, 1992) demostraron que la materia orgánica del suelo es la característica edáfica que más influye sobre el movimiento de los pesticidas y es por ello que estos se adsorben más fuertemente a las capas superficiales del suelo. En los suelos de la provincia de Córdoba, en general, la materia orgánica se concentra en el estrato superior en unos pocos centímetros para luego disminuir su concentración drásticamente en las capas más profundas (Hang y Sereno, 2002 y Hang *et al.*, 2007). Por lo expuesto es que, se utilizó para la modelación de la cuenca Los Molinos una profundidad de suelo de 30 cm, ya que se considera que esta capa puede mantener condiciones homogéneas y con la mayor fracción de materia orgánica responsable de la retención del pesticida (Di Guardo *et al.*, 1994; Natale, 1995) y se consideró una fracción

de materia orgánica de 1,8%, ya que corresponde al valor que ha sido determinado en suelos cordobeses (Hang y Sereno, 2002 y Hang *et al.*, 2007).

En relación con el tipo de manejo de cultivo en la zona, se utiliza la siembra directa principalmente para soja la cual representa entre un 80 a un 85% del área cultivada con granos (Domínguez *et al.*, 2009). Esto se debe fundamentalmente a que las condiciones del suelo locales son pobres con un alto riesgo de erosión. El hecho de que no haya laboreo mecánico hace que se conserve la estructura del suelo, aunque como contraparte bajo la siembra directa la preparación del barbecho químico exige aplicaciones adicionales de agroquímicos que en suma incrementan la presencia de estos compuestos en el ambiente (Domínguez *et al.*, 2009)

Diversos trabajos mencionan que la atrazina presenta una mayor retención en el estrato superior del suelo dependiendo principalmente del contenido de materia orgánica (Hang *et al.*, 2003; 2007). De este modo, la dinámica de la atrazina en los primeros centímetros de suelo estará muy relacionada con las prácticas de manejo del suelo. Otro factor que puede influir en la retención de la atrazina, aunque no tan marcadamente, puede ser el pH. Los suelos de Córdoba presentan un pH de 6, especialmente en la capa superior (0-18 cm) y debido a que la atrazina es una base débil explicaría la tendencia de la atrazina a ser adsorbido al suelo (Hang *et al.*, 2007).

Por otro lado, debido a la alta solubilidad que tiene el herbicida 2,4-D es de esperar que el compuesto pase a la fracción del agua con mucha facilidad y su retención en suelo sea relativamente baja, aunque la absorción a la materia orgánica afecta esta capacidad de ser movilizado (Goss, 1992; Miller y Westra, 1997; Dubus *et al.*, 2001). En un trabajo publicado recientemente hallaron que la presencia de carbonatos aumenta significativamente la capacidad del 2,4-D de lixiviar (Gaultier *et al.*, 2012). Además de considerar que el 2,4-D puede ser degradado en parte por los microorganismos del suelo, en base a la modelación realizada en este trabajo se puede observar que las pendientes de decaimiento en el suelo del 2,4-D son más marcadas que con atrazina, lo cual señala una mayor capacidad de lixiviar. La presencia de carbonatos en el suelo de la cuenca del embalse, clasificado como bicarbonatado mixto (Pasquini *et al.*, 2004; Volmer Buffa y Ratto, 2005), podría favorecer el lavado del 2,4-D del suelo.

Cuando un pesticida se agrega al suelo, parte quedará adsorbido a las partículas mientras otra parte quedara disuelta en el agua del suelo y la concentración relativa de cada fase dependerá del coeficiente de adsorción de la unión específica de la partícula/suelo (Williams *et al.*, 1995; Barra *et al.*, 1999; Calamari y Zhang, 2002).

De la modelación del área cultivada de 100 ha, surge que la concentración esperada de atrazina en el agua de escorrentía debería hallarse entre 1,29 a 3,21 $\mu\text{g/L}$ mientras que, para un área de cobertura 3000 ha luego de la aplicación simultánea del herbicida la concentración esperada podría detectarse en un rango de 38,6-96,4 $\mu\text{g/L}$. Como ya se mencionó que este compuesto presenta un decaimiento lento, luego de 60 días aproximadamente desde su aplicación, la concentración en agua decaería a la mitad (Figura I-4). Esto comprueba la persistencia de atrazina en agua tal como lo destacan autores como Natale (1995) en suelo de Bigand (Santa Fe, Argentina), donde para las condiciones de precipitaciones dadas durante el período 1999-2000, el herbicida atrazina mostró ser el más persistente entre otros 27 plaguicidas evaluados; siendo necesarios cerca de 200 días para que su concentración en el agua de escurrimiento y percolado se reduzca a 1 $\mu\text{g/L}$ partiendo de una aplicación de 4-5 L/ha.

Respecto de la concentración de 2,4-D en agua el modelo predijo que, considerando las dosis típicas utilizadas tanto en sorgo como en soja, las concentraciones en agua de escorrentía y percolado estarían siempre por debajo de 2 $\mu\text{g/L}$ y para el quinto evento de lluvia, (equivalente a 26 días consecutivos desde su aplicación), el compuesto disminuiría a la mitad (0,1 $\mu\text{g/L}$) en el agua del embalse. En el caso del escenario 2 para el cual se estimó la cobertura máxima de siembra de 5000 ha, luego de la aplicación del herbicida, la concentración en el agua de escorrentía estaría cerca de 40 $\mu\text{g/L}$. Sin embargo, de la modelación del 2,4-D, surge que es susceptible de ser degradado antes de llegar a los cuerpos de agua, aunque una vez que llega al mismo su decaimiento es más lento, lo que se puede comprobar al comparar las pendientes de decaimiento del 2,4-D en agua y suelo (Ver salidas del SoilFug Figura I.6.1.3-4). Cabe destacar que, si bien la toxicidad del 2,4-D es baja a moderada, el hecho de ser utilizado para diferentes cultivos incrementa las posibilidades de ingreso a los cuerpos de agua circundante a la zona de cultivos, aumentando el riesgo que representa para los organismos acuáticos.

Tal como se mencionó en la introducción de esta tesis, la Secretaria de Recursos Hídricos de la Nación en base a recomendaciones internacionales, ha establecido como valor de referencia para la protección de la vida acuática que la concentración de atrazina debería ser menor a 3 $\mu\text{g/L}$ y la concentración de 2,4-D debería ser menor a 3,4 $\mu\text{g/L}$. En función de las dosis que son utilizadas en campo para atrazina y 2,4-D en la cuenca del embalse Los Molinos, y considerando los resultados obtenidos de la modelación de una única aplicación, las concentraciones estimadas en agua de escorrentía se encontraría por debajo del límite de los niveles guía para protección de la vida acuática en el caso del 2,4-

D ($\leq 3,4 \mu\text{g/L}$), aunque no así para la atrazina, la cual podría presentar valores superiores a $3 \mu\text{g/L}$ considerando exclusivamente un campo de 100 ha. Debido a que en general son varios campos los que son sembrados en una época, es posible que los herbicidas puedan llegar y eventualmente ser detectados en concentraciones superiores a aquellas recomendadas por la Secretaria de Recursos Hídricos de la Nación constituyendo un riesgo para la salud del hombre.

Otro aspecto que hay que mencionar en relación a la dispersión de los herbicidas tiene que ver con el momento de aplicación de los mismos en el ciclo de cultivo (Bergel Santibañez, 2004). No cabe duda que las dosis de pesticidas más importantes, en términos de la fracción que llega al suelo, son aquellas que se aplican durante la presembrado ya que el suelo se encuentra casi sin cobertura vegetal; mientras que las posteriores aplicaciones, que en general ocurren durante la post-emergencia, el crecimiento de las plántulas actúa como una barrera que impide que el pesticida llegue al suelo o que lo haga en menor medida (Solomon *et al.*, 1996).

En la cuenca del embalse Los Molinos por cada tipo de cultivo se aplican entre dos a tres dosis de herbicidas a lo largo del desarrollo del cultivo fundamentalmente durante la presembrado y la post-emergencia (CASAFE, 2007). Esto refuerza la presunción que las aplicaciones múltiples de pesticidas a lo largo del ciclo de un cultivo, sumado a la capacidad que tiene el suelo de retener e ir liberando lentamente los pesticidas, es lícito pensar que hay un frecuente y continuo ingreso de pesticidas a los cuerpos de agua circundantes.

Si bien en muestras de agua tomadas en el sitio de monitoreo de la desembocadura de río Los Reartes, los valores de atrazina y 2,4-D se mantuvieron por debajo del límite de detección de las técnicas (ver Materiales y Métodos), la atrazina fue detectada en muestras tomadas en otoño (2010 y 2011) en el tramo del río Los Reartes en concentraciones de 8 y 12 $\mu\text{g/L}$ respectivamente (se adjunta cromatograma de atrazina en Figuras Complementarias Figura I.6.2).

En un monitoreo de pesticidas realizado en la cuenca del río Traiguén en el sur de Chile se registraron residuos de 2,4-D con una concentración máxima de $2,9 \mu\text{g/L}$ (Palma *et al.*, 2004). En ese trabajo se destacaron que estos niveles pueden ejercer efectos adversos en los organismos acuáticos y puntualizaron acerca del hecho de que el ingreso frecuente a los cursos de agua puede alterar las comunidades acuáticas a largo plazo por lo cual es necesario la implementación de medidas tendientes a restringir el uso de herbicidas, en particular en las zonas aledañas a las aguas superficiales.

La no detección puede estar asociado fundamentalmente a las técnicas empleadas, la elección inadecuada del momento del monitoreo, o incluso la profundidad a la cual se toma la muestra de agua. Estos y otros factores pueden afectar en la determinación de los diferentes pesticidas. Por otra parte y a juzgar por lo que concluyen los autores de diversos trabajos de modelación con el SoilFug, el modelo tiende a sobreestimar las concentraciones en agua (Di Guardo *et al.*, 1994). En este trabajo, las predicciones que se obtienen de aplicar el modelo para el embalse Los Molinos pueden también hallarse por encima de las concentraciones que efectivamente pueden llegar a las aguas del embalse. En suma, y tal como lo destaca Brock y col. (2006), la no detección no implica que no se encuentre el pesticida, es por este motivo que el uso de modelos de dispersión es de gran importancia en el manejo de cuencas y planes de gestión ya que permiten contar con un marco de referencia.

Uno de las limitaciones más importantes que afronta el empleo de modelos, tal como lo describen Finizio y Vighi (2005), es la disponibilidad de información confiable acerca del uso de los pesticidas en la zona bajo estudio. Los ejemplos utilizados en este trabajo están basados en datos reales representativos de las aplicaciones más frecuentes de pesticidas y sirve como punto de partida para conocer las posibles concentraciones en agua. En este sentido, se puede agregar que la falta de control o el uso indebido de los pesticidas puede superar los datos reportados.

La predicción del comportamiento de los pesticidas liberados en el ambiente provee una visión global de la compartimentalización de los pesticidas y así se puede anticipar, y por ende minimizar, los impactos adversos en aquellos organismos no-blanco (Wagenet y Rao, 1990). Al existir numerosos modelos de dispersión de pesticidas con distintos niveles de complejidad y diseñados para una variedad de aplicaciones diferentes, hay que tener criterios claros a la hora de elegir con cuales trabajar y que información se espera obtener de la modelación, ya que cada uno puede ser más adecuado en función de los datos disponibles y de la información requerida (Quilbé *et al.*, 2006). Debido a que la información acerca del uso y presencia de pesticidas en la cuenca del embalse Los Molinos es escasa, los modelos de dispersión más simples como el SoilFug, son adecuados para establecer un marco de referencia para apreciar el impacto de los pesticidas utilizados en la región. En especial si se asume que la actividad agrícola incrementa paulatinamente el uso de estos compuestos tanto para mejorar sus rendimientos como debido al incremento de la resistencia de las malezas a los pesticidas.

I.5- CONCLUSIONES

De la modelación se puede concluir que:

- La atrazina y el 2,4-D no se volatilizan.
- En base al escenario más simple y utilizando las dosis declaradas, que además son las recomendadas por la fitoterapéutica (CASAFE, 2007), podría detectarse en el agua de escorrentía que drena hacia el río Los Reartes tanto atrazina como 2,4-D en concentraciones entre 1-4 $\mu\text{g/L}$ y 0,3-0,7 $\mu\text{g/L}$, respectivamente
- La atrazina es más persistente tanto en suelo como en agua que el 2,4-D.
- El 2,4-D decae rápidamente en suelo y en agua. El compuesto puede decaer a la mitad de su concentración luego de unas pocas lluvias; mientras que la atrazina decae a la mitad de su concentración inicial luego de 60 días o bien, 10 eventos de lluvias posterior a su aplicación.
- La poca cantidad de materia orgánica (1,8%) del suelo presenta una baja a moderada capacidad amortiguadora para evitar la lixiviación. Por lo cual, aumenta el impacto que pueden tener los agroquímicos en la zona.

Aunque la información precisa sobre aplicaciones es difícil de obtener, las prácticas agrícolas son relativamente uniformes en determinadas áreas, estando relacionadas con condiciones climáticas, tipo de plagas y hábitos de los productores (Barra *et al.*, 2000). En este sentido, la información relacionada a las condiciones de aplicación utilizada en el presente trabajo, las cuales surgen de las fichas fitosanitarias presentadas en las comunas, así como de entrevista realizadas a técnicos que trabajan en la zona, se considera que dicha información fue lo suficientemente fidedigna como para asegurar la confiabilidad de los resultados obtenidos por la aplicación del modelo.

I.6 FIGURAS COMPLEMENTARIAS

I.6.1 Salida gráficas de la modelación con Soilfug

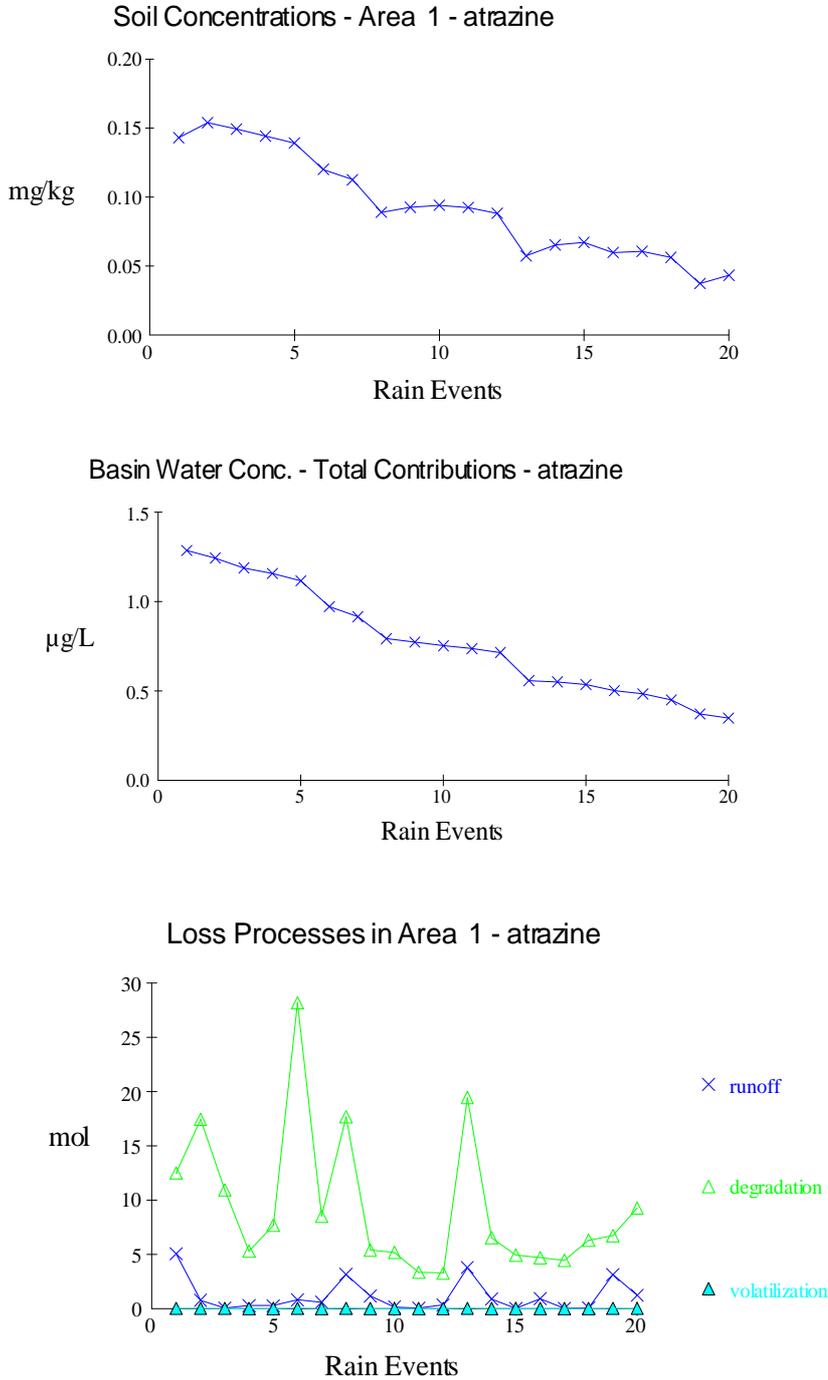


Figura I.6.1.1. Modelación de atrazina. Escenario de dispersión 1. 100 ha. Atrazina

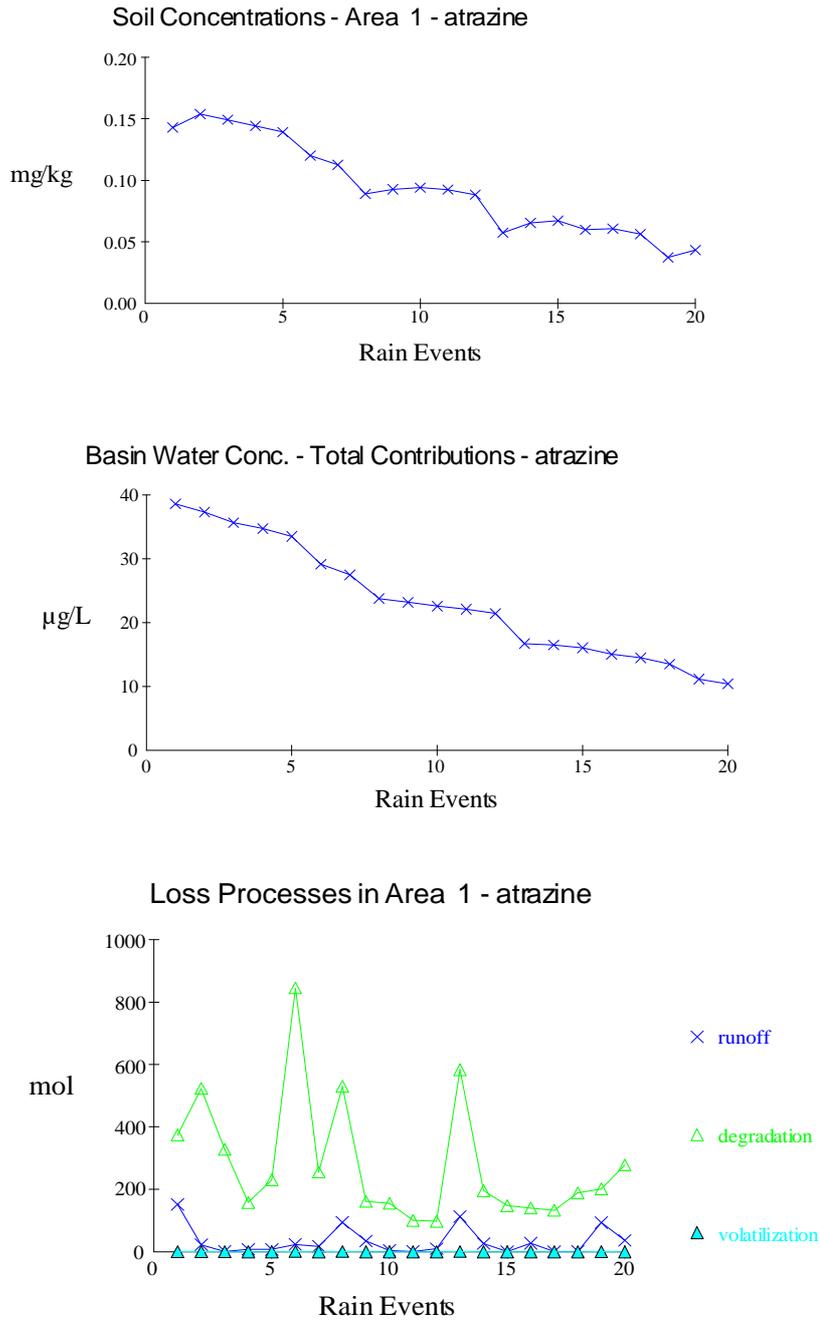


Figura I.6.1.2. Modelación de atrazina. Escenario de dispersión 2. 3000 ha. Atrazina

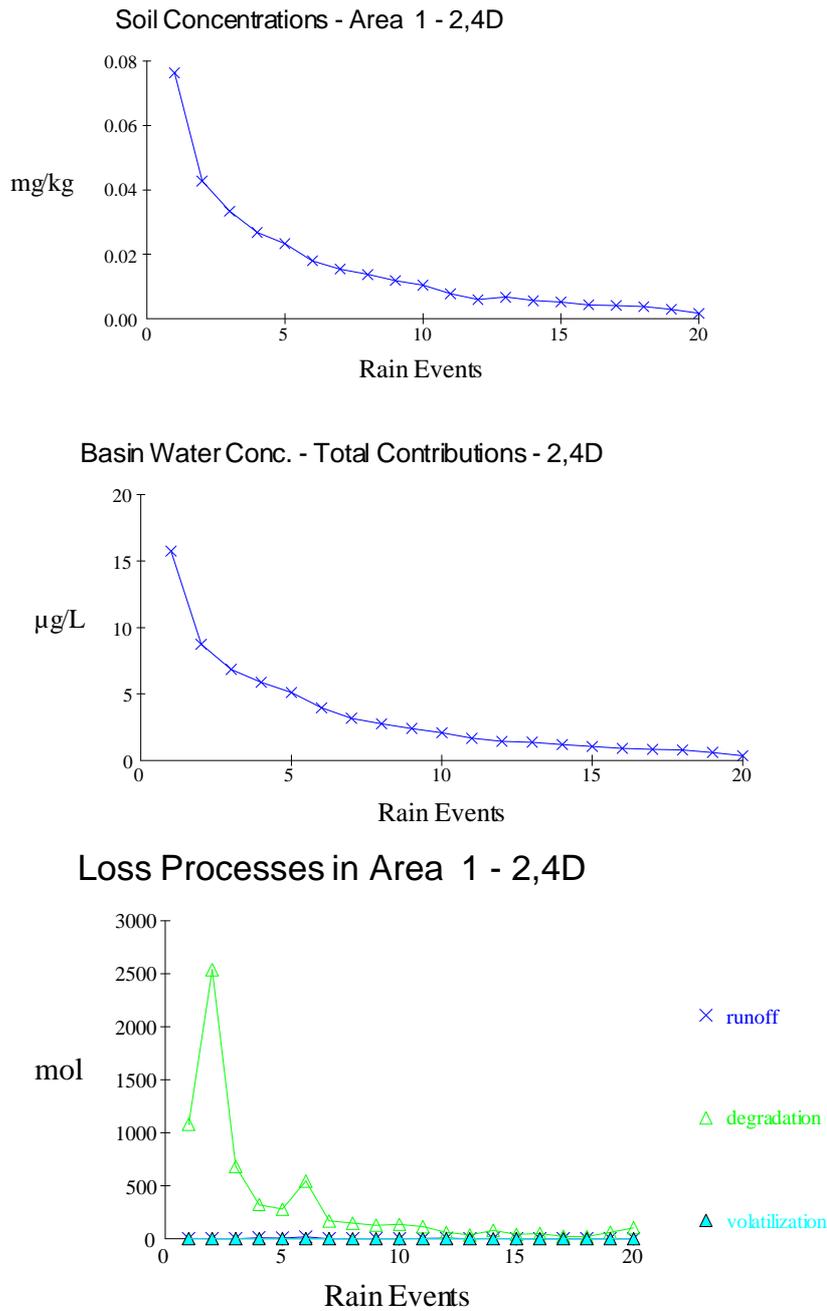


Figura I.6.1.3. Modelación de 2,4-D. Escenario de dispersión 1. 100 ha. 2,4-D

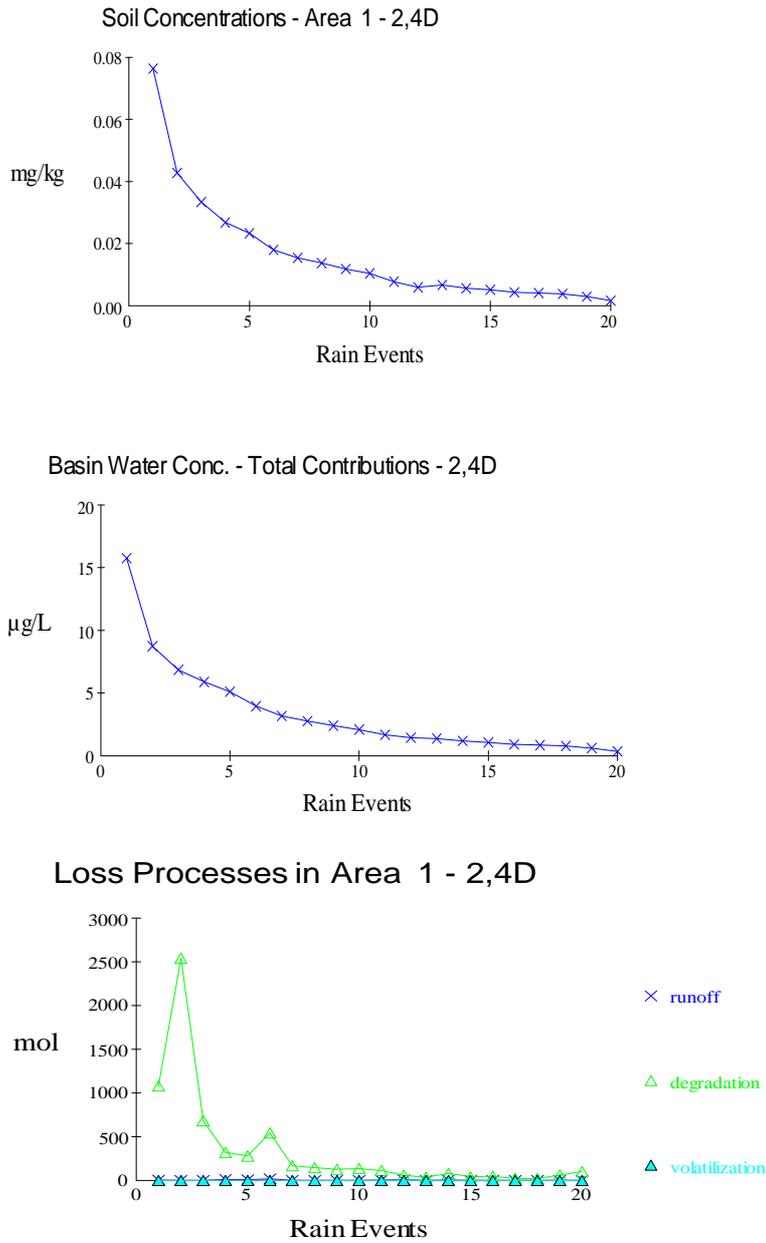
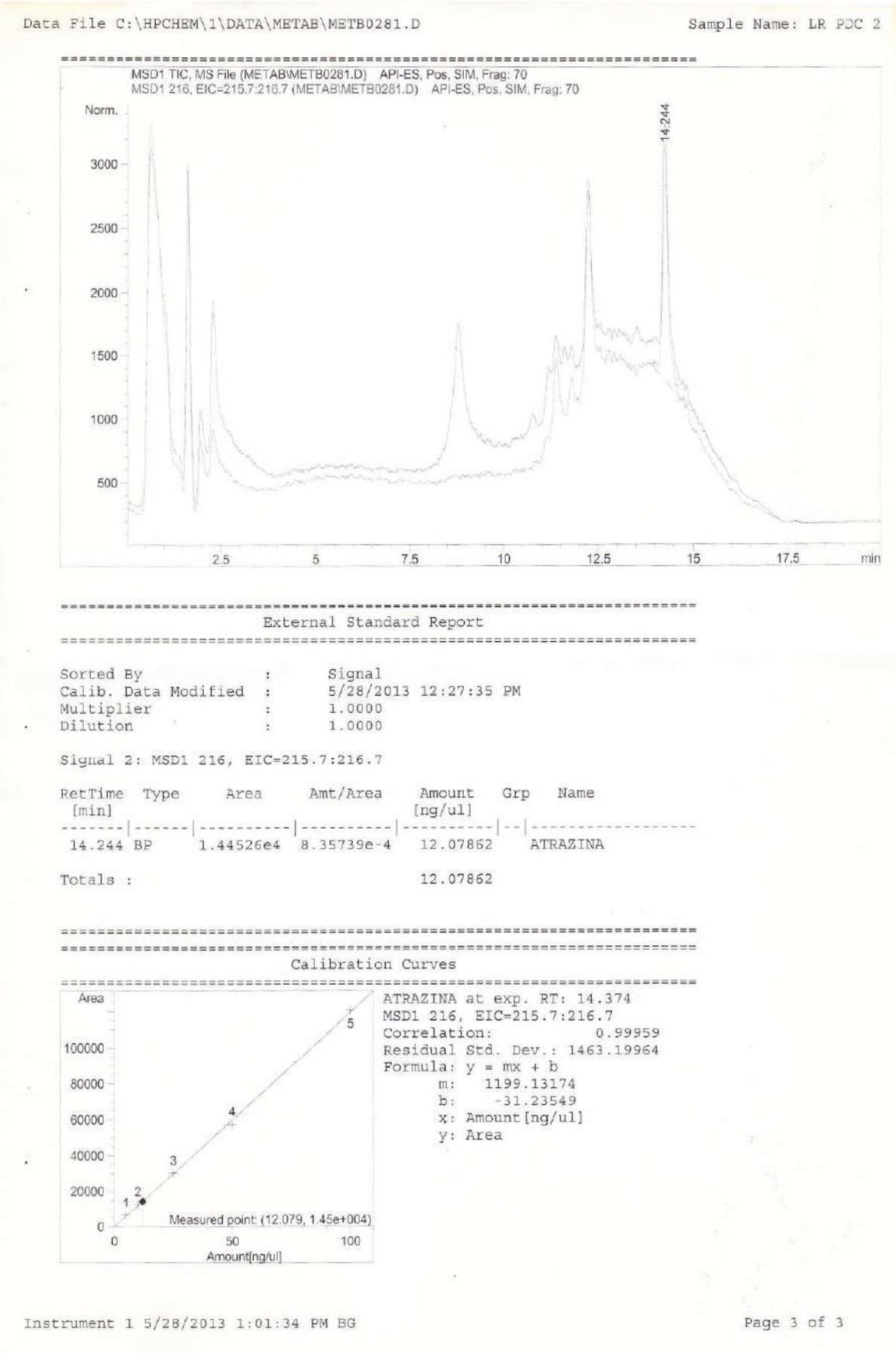


Figura I.6.1.4. Modelación de 2,4-D. Escenario de dispersión 2. 5000 ha. 2,4-D

I.6.2 Cromatograma de atrazina



I.6.3. Ejemplos de fichas fitosanitarias



Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentos
 Secretaría de Agricultura
RECETA FITOSANITARIA

Nº 60007156

Fecha: 13/7/09 Lugar de Emisión: Oncativo, Cba Serie: A Número:
 Usuario: Jose Luis GOMEZ Domicilio: LAS MAGNOLIAS 80 - VA. 6AA | BE/PAAVO

Lote Nº	Cultivo	Superficie (ha.)	Plaga	Producto, Formulación, Concentración	Momento de Aplicación	Indicaciones de uso	Carencia (días)
1	Barbecho	15	MALEZAS	GLIFOSATO 40% (Lipido)	Post. Emerg.	30-40 pots/cm ²	-
1	Barbecho	15	MALEZAS	BICAMBA 57,7% (Lip.)	Post. Emerg.	30-40 pots/cm ²	-
1	Barbecho	15	MALEZAS	SAL AMINA 2,4 D 96,3% (Granulado)	Post. Emerg.	30-40 pots/cm ²	-

Observaciones:
 Aplicar sin viento - Aplicación 30-40 pots/cm².
 Dosis a aplicar: GLIFOSATO 0,7/4 - BICAMBA 30 cu/ha - SAL AMIN 200 g/ha - CLASE TOXICOLOGICA CALDO: CLASE IV

Los lotes a tratar se encuentran ubicados cerca de áreas sensibles, (tachar lo que no corresponda):

SI - NO

Los datos de áreas susceptibles fueron suministrados por el Usuario responsable.

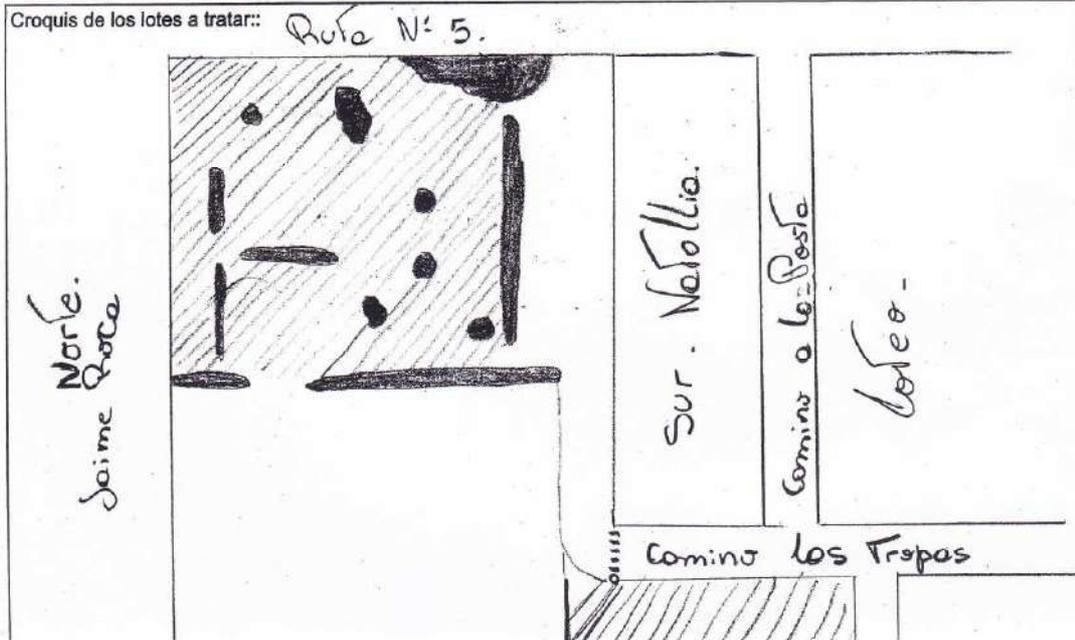
Firma:

D.N.I.: 22.588.406

Firma y Sello del Profesional
 Matricula Nº 0942



No estando la aplicación bajo supervisión del Profesional firmante, el mismo no se hace responsable de accidentes, daños, perjuicios y/o resultados insatisfactorios derivados del uso incorrecto de el/los producto/s recomendado/s.



Respuesta de la Comunidad Bacteriana presente en el Embalse Los Molinos (Córdoba, Argentina) expuesta a Pesticidas

Lote Nº	Cultivo	Superficie (ha.)	Plaga	Producto, Formulación, Concentración	Momento de Aplicación	Indicaciones de uso	Carencia (días)
1	Mziz	30	Malezas Mziz	Dual Gold 5 Metolachloro 96% Concentrado emulsionable	Preemergencia de las Mziz	0,85 l/ha	Sembiar Cultivos Resumen datos
				Atzizine TAC 50% Suspensión concentrada	Prey Post emergencia de las Mziz	2,2 l/ha	
				Atzizto Superestrella III 66,2% SL	Con Mz Presente	1 l/ha	No pasee

Observaciones:

Mz: Mzlezzs

Atzizine CLASE II DUAL CLASE III S ESTRELLA CLASE IV

Los lotes a tratar se encuentran ubicados cerca de áreas susceptibles (tachar lo que no corresponda):

SI Los datos de áreas susceptibles fueron suministrados por el Usuario responsable.

Dario Jose Vallejo
Firma y Sello del Profesional

DARIO JOSE VALLEJO
INGENIERO AGRÓNOMO
M. P. 2522

Firma: *Dario Jose Vallejo* D.N.I.: 24249968

Matrícula Nº 2522

No estando la aplicación bajo supervisión del Profesional firmante, el mismo no se hace responsable de accidentes, daños, perjuicios y/o resultados insatisfactorios derivados del uso incorrecto de el/los producto/s recomendado/s.

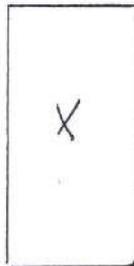
Croquis de los lotes a tratar:

Dual Gold = Metolachloro (fórmula)

← ROTA A CORDOBA

N

CAMINO VILLA GALICIA



X LOTE A TRATAR
S RECIBIDO

FECHA: 25/11/10
HORA: 9:55

Reservado Aplicador

Al modificar condiciones de aplicación, detallar razones y características:

Condiciones meteorológicas de aplicación al inicio:			Condiciones meteorológicas de aplicación al final:		
Temp. (°C)	H.R. (%)	Viento (km/h)	Temp. (°C)	H.R. (%)	Viento (km/h)

Firma del Aplicador:

Aclaración:

ANEXO II. ESTUDIO COMPLEMENTARIO

CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y SANITARIA DEL AGUA DEL EMBALSE LOS MOLINOS

II.1- INTRODUCCION

El registro permanente y sistemático de los parámetros de calidad permite la construcción de una base de datos imprescindible para la interpretación de los procesos que participan en la dinámica del recurso agua (Ruibal Conti *et al.*, 1999). El propósito de incorporar esta evaluación al trabajo de Tesis es, por un lado caracterizar y evaluar la calidad de las aguas del embalse Los Molinos mediante parámetros fisicoquímicos, y por otro determinar el estado sanitario de las aguas a partir diversos indicadores bacteriológicos de contaminación fecal. Este análisis permite establecer las variaciones espaciales y estacionales de la calidad sanitaria del agua del embalse, y determinar en que zonas del mismo se presentan condiciones de riesgo para la salud del hombre por exposición a fuentes de contaminación fecal.

II.2- MATERIALES Y MÉTODOS

II.2.1 Monitoreo del embalse Los Molinos

Los sitios seleccionados para la toma de muestras dentro del embalse Los Molinos: desembocaduras de los ríos Los Reartes (DLR), San Pedro (DSP) y Los Espinillos (DEL), Centro (CE) y Pared del Dique del embalse (PD) fueron presentados en el cuerpo principal de la Tesis (Figura 3-1). Además se especifican las condiciones de toma de muestras, preservación, traslado, etc.

Con el fin de evaluar los cambios que ocurren en la calidad del agua de acuerdo a la estación de año, se agruparon los datos de los meses correspondientes a verano (enero-marzo), otoño (abril-junio), invierno (julio-septiembre) y primavera (octubre-diciembre) por separado. El número máximo de muestras analizadas en cada sitio de monitoreo para cada estación fue de seis (6). El número de muestras extraídas en los meses de invierno fueron escasos (1-3 muestras) debido en parte a que estudios previos confirmaron la homogeneidad de los valores durante el periodo invernal (Cossavella,

2003; Bazán *et al.*, 2005), y además porque las condiciones climáticas suelen ser adversas para realizar las tareas que requiere el monitoreo.

II.2.2 Análisis fisicoquímicos

El personal de la empresa Aguas Cordobesas y de la Cátedra de Microbiología General y de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Córdoba realizaron las siguientes determinaciones: fósforo total (PT), fósforo reactivo soluble (PRS), amonio (N-NH_4^+), nitrato (N-NO_3^-) y nitrito (N-NO_2^-), alcalinidad, dureza y clorofila- α de acuerdo a lo establecido por *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005). Por otro lado, la determinación de carbono orgánico total (TOC) y demanda química de oxígeno (DQO) fueron realizadas en el Laboratorio Experimental de Tecnologías Sustentables del Instituto Nacional del Agua.

Para la Determinación del Carbono Orgánico Total se empleó un equipo TOC-5000 Analyzer Shimadzu. Para evaluar la Demanda Química de Oxígeno (DQO) se empleó el método colorimétrico de reflujo cerrado. La reacción se llevó a cabo en un reactor Hach a 150 °C durante 2 horas y se determinó mediante espectrofotometría visible a 420 nm en un espectrofotómetro Hach. Ambos procedimientos se realizaron en base a los protocolos del *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (5310 y 5220D para TOC y DQO respectivamente) (APHA, 2005).

Para este trabajo se consideraron las determinaciones físicas y químicas correspondientes a los monitoreos realizados entre el 2009 y 2011. En el caso de las determinaciones bacteriológicas se incluyeron aquellas realizados desde el año 2008 hasta 2011.

II.2.3 Análisis bacteriológicos

El análisis bacteriológico consistió en la determinación del número de bacterias heterótrofas totales, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*, estreptococos fecales, enterococos. Todas las determinaciones se realizaron de acuerdo al *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005).

Para el recuento de bacterias heterótrofas se utilizó el método de recuento en placa de Petri conteniendo Agar Tripteína Soja (*Tryptic Soy Agar-TSA*) (SM-9215B). Para las restantes determinaciones bacteriológicas se empleó la técnica de tubos múltiples en serie de 3 tubos. La detección de bacterias coliformes termotolerantes se realizó en base al protocolo SM-9221E, utilizando el caldo Mac Conkey e incubando los tubos sembrados

a 44,5 °C durante 48 h. Aquellos tubos que presentaron turbidez, viraje de color y gas fueron considerados positivos. Posteriormente se realizó la confirmación de *E. coli* mediante la prueba de indol (SM-9220D).

Para el análisis de los estreptococos fecales se utilizó el caldo Azida-Dextrosa incubados a 35 °C durante 48 hs (SM-9230B). La confirmación de enterococos se realizó por repique en placas con agar Bilis esculina de los tubos que presentaron turbidez en el caldo Azida-Dextrosa. Las colonias que presentaron un halo pardo oscuro (producto de la hidrólisis de la esculina y formación de un complejo con el citrato de hierro (III) de un color pardo oscuro) fueron sembradas en 5 mL de caldo tripticasa-soya (*Tryptic soy broth-TSB*) con 6,5% de cloruro de sodio para determinar el grupo enterococos. Los tubos que presentaron turbidez luego de 24-48 hs fueron considerados positivos y expresados como el Número Más Probable (NMP) de enterococos por 100 mL.

Los medios de cultivo fueron provistos por Biokar Diagnostics (Beauvais, Francia) y por Laboratorios Britania S.A. (Buenos Aires, Argentina).

II.2.4 Análisis estadístico

Los valores de los parámetros físicos, químicos y biológicos obtenidos de los monitoreos realizados en el embalse Los Molinos fueron analizados mediante la media aritmética, mediana muestral, los valores mínimos y máximos y los desvíos estándares. Se consideró el valor de la mediana ya que coincide con el percentil 50 y su cálculo es resistente a valores atípicos. Al comparar la media con la mediana se puede tener una medida del grado de asimetría de los valores registrados. El cálculo de los desvíos estándar permite conocer cual es el intervalo de dispersión de los valores de los parámetros. En las Tablas complementarias presentadas al final de esta sección Figuras II.1.A.1, II.A.2 y II.A.3 se presentan los datos obtenidos de cada parámetro agrupado por estación del año.

Para evaluar el comportamiento de las variables fisicoquímicas y biológicas se graficaron los datos en Boxplots, siendo la línea media el valor de la mediana muestral. Se empleó la correlación de Spearman para el análisis estadístico descriptivo, en especial cuando los datos no tuvieron distribución normal bivalente con valores extremos. Los paquetes estadísticos empleados fueron: GraphPad (San Diego, CA. Estados Unidos).

II.2.5 Evaluación del estado trófico

Para definir el estado trófico de un cuerpo de agua y tener un dato comparativo con otros sistemas se utilizan índices del estado trófico calculados en base a diferentes parámetros fisicoquímicos.

La evaluación del estado trófico se basa en comparar los datos obtenidos experimentalmente contra valores fijos propuestos por rangos para cada índice. La OCDE (1982) utiliza el promedio anual de Fósforo Total (PT), promedio anual de clorofila- α a nivel superficial, máximo anual de clorofila- α , promedio y mínimo anual de la transparencia del agua determinada mediante disco de Secchi (DS) (Tabla II-1).

Tabla II-1 Sistema de clasificación del estado trófico de un cuerpo de agua. Valores de la OCDE (1982).

ESTADO TRÓFICO	MEDIA	MEDIA	MAXIMO	MEDIA	MINIMO
	PT	Clorofila- α	Clorofila- α	Disco de Secchi (DS)	Disco de Secchi (DS)
ULTRAOLIGOTRÓFICO	<4	<1	<2,5	>12	>6
OLIGOTRÓFICO	<10	<2,5	<8	>6	>3
MESOTRÓFICO	10-35	2,5-8	8-25	6-3	3-1,5
EUTRÓFICO	35-150	8-25	25-75	3-1,5	1,5-0,7
HIPEREUTRÓFICO	>150	>25	>75	<1,5	<0,7

Referencias

TP: media anual de la concentración de fósforo total en el agua ($\mu\text{g/L}$)

Media Clor- α : media anual de la concentración de clorofila- α en aguas superficiales ($\mu\text{g/L}$)

Máximo Clor- α : máximo anual de la concentración de clorofila- α en aguas superficiales ($\mu\text{g/L}$)

Media de Secchi: media anual de transparencia de la profundidad de Secchi (m)

Mínimo de Secchi: mínimo anual de transparencia de la profundidad de Secchi (m)

Otro método ampliamente aceptado y utilizado es el índice numérico del estado trófico (*Trophic State Index*, TSI) propuesto por Carlson (1977) (Tabla II-2). Las variables utilizadas en este índice son los valores medios anuales de la profundidad determinada con disco de Secchi (DS) y de las concentraciones superficiales de PT y clorofila- α , los cuales son transformados por el logaritmo natural:

Tabla II-2 Sistema de clasificación del estado trófico de un cuerpo de agua. Índice numérico del estado trófico (*Trophic State Index*, TSI) propuesto por Carlson (1977)

PARAMETROS	FUNCIÓN
Profundidad-Disco de Secchi (m)	$TSI (DS) = 60 - 14,41 * \ln (DS)$
Fosforo total ($\mu\text{g/L}$)	$TSI (PT) = 14,42 * \ln (PT) + 4,15$
Clorofila- α ($\mu\text{g/L}$)	$TSI (clor) = 9,81 * \ln (clor) + 30,6$
MEDIA TSI	$Media TSI = [TSI (DS) + TSI (PT) + TSI (clor)] / 3$

Este índice, reduce el estado trófico de un lago dentro de una escala de valoración (en una escala de 0 a 100), en un intento por evitar la subjetividad inherente a los términos oligotrófico, mesotrófico y eutrófico. Un valor de la Media de TSI inferior a 20 representa una condición ultraoligotrófica; entre 30 y 40, oligotrófica; entre 40 y 50, mesotrófica; entre 50 y 60, eutrófica y por encima de 70, hipereutrófica.

II.3- RESULTADOS

II.3.1 Evaluación espacio-temporal de la calidad de las aguas del embalse Los Molinos

II.3.1.1 Análisis de parámetros fisicoquímicos

Se analizaron los datos obtenidos para cada parámetro considerando las variaciones estacionales y temporales. En las Figuras II-1, II-2 y II-3 se presentan los resultados del análisis de los parámetros en Boxplot.

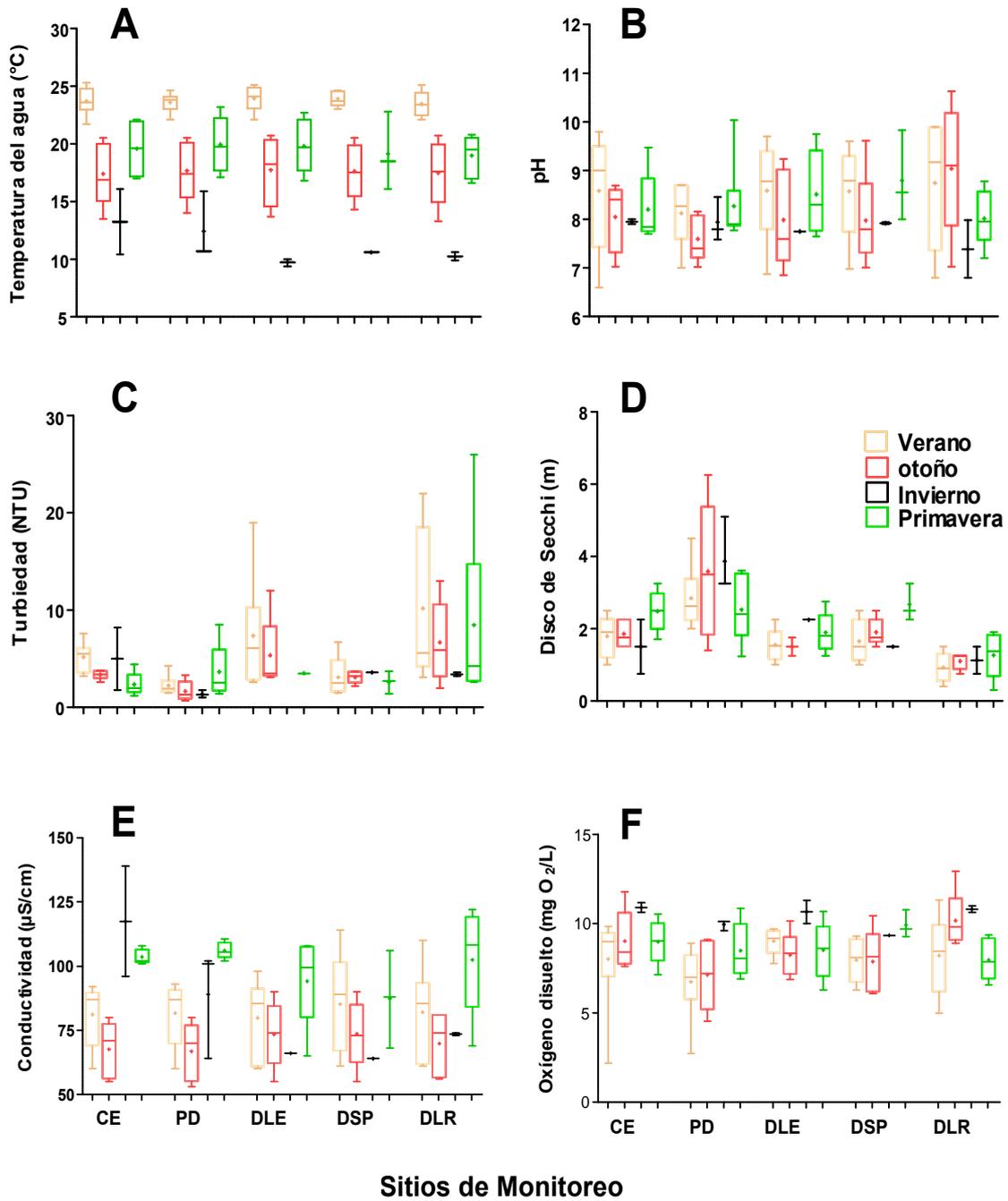


Figura II-2. Variación espacio-temporal de: A) temperatura del agua, B) pH, C) turbiedad, D) disco de Secchi, E) conductividad y F) oxígeno disuelto. Sitios de monitoreo: Desembocadura de los ríos Los Reartes (DLR), Los Espinillos (DLE), San Pedro (DSP), y centro (CE) y pared del dique del embalse (PD).

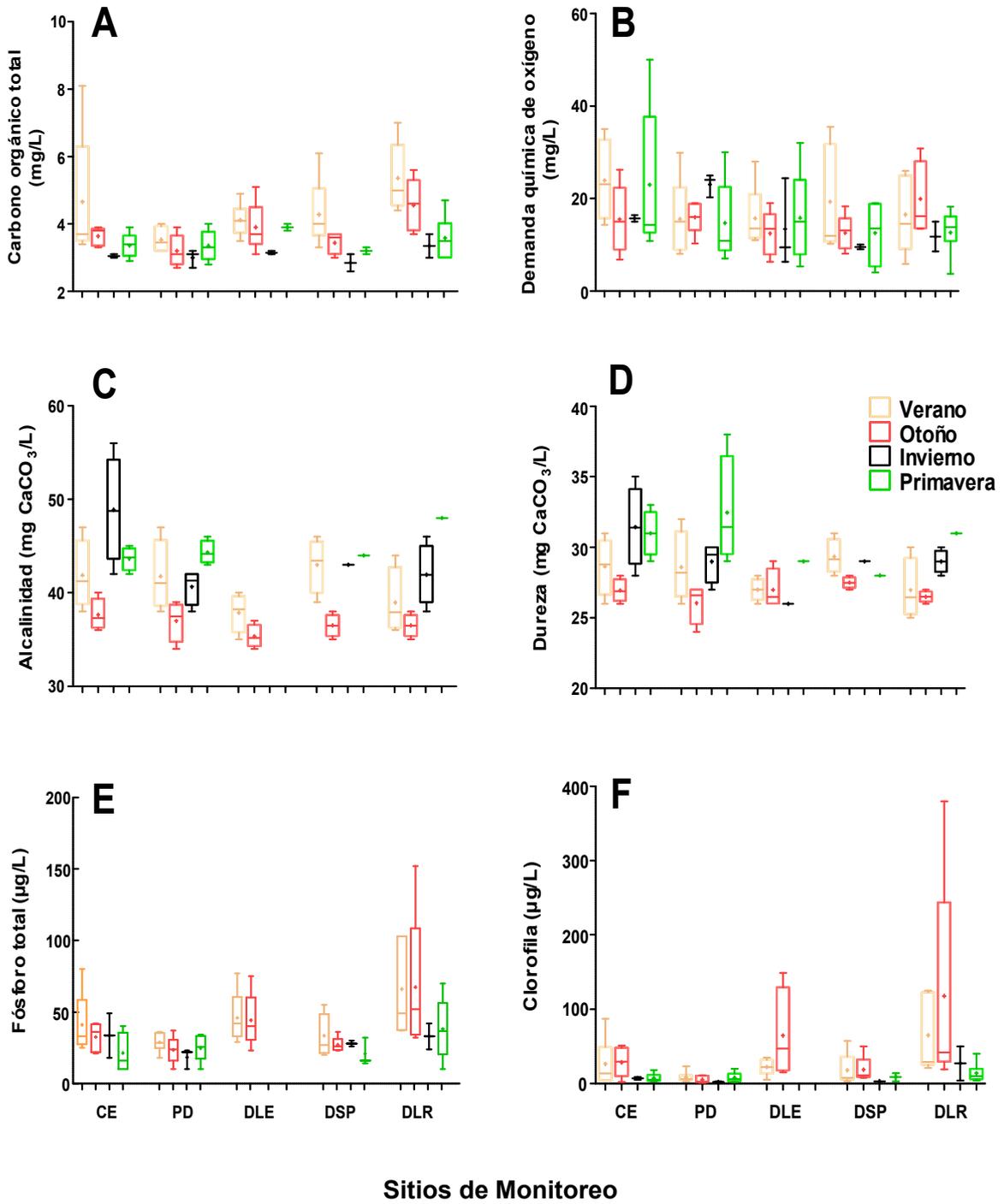


Figura II-2. Variación espacio-temporal de: A) TOC, B) DQO, C) alcalinidad, D) dureza, E) PT y F) dorofila- α . Sitios de monitoreo: Desembocadura de los ríos Los Reartes (DLR), Los Espinillos (DLE), San Pedro (DSP), centro (CE) y pared del dique del embalse (PD).

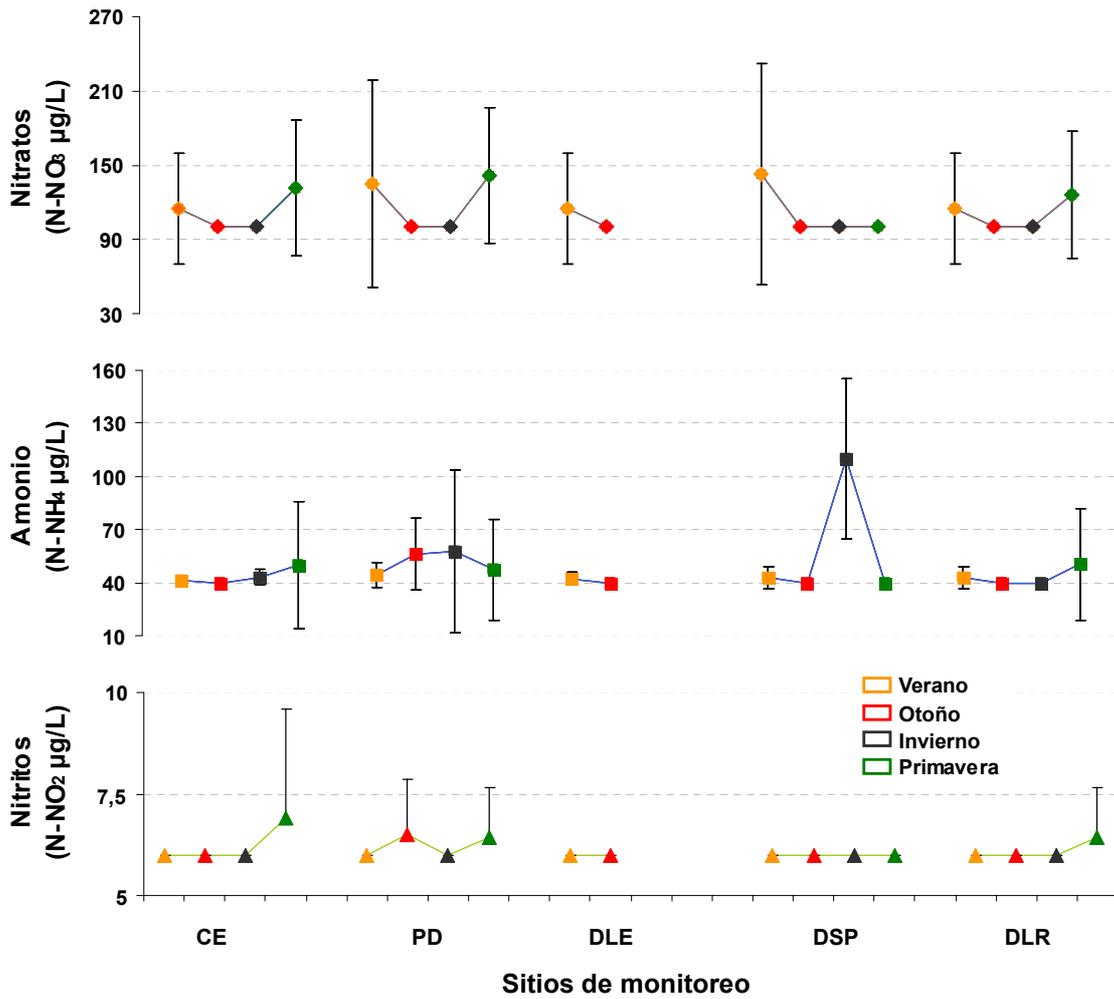


Figura II-3. Variación espacio-temporal de la concentración de nitrato, amonio y nitrito expresados como concentración de nitrógeno. Sitios de monitoreo: Desembocadura de los ríos Los Reartes (DLR), Los Espinillos (DLE), San Pedro (DSP), centro (CE) y pared del dique del embalse (PD)

Los resultados obtenidos se describen a continuación:

Temperatura del agua: la temperatura del agua a nivel superficial se halló dominada por la temperatura atmosférica. Las variaciones obtenidas corresponden a las distintas épocas del año, siendo los valores medios en verano, otoño, invierno y primavera de 23,2; 17,4; 10,5 y 19,2 °C respectivamente. La temperatura más bajas registrada fue de 9,4 °C, y la más alta fue de 25,3 °C. (Figura II.1.A)

pH: Los valores medidos de pH a lo largo del año se mantuvo dentro del rango de 7 a 9 con tendencia a la alcalinidad. Se registraron valores más bajos a 7 durante la estación de

verano en los sitios de monitoreo CE y DLR (pH 6,6 y de 6,8 respectivamente). Más aún, se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los valores medios de las muestras de verano y otoño ($P = 0,0074$) y de verano e invierno ($P = 0,0074$) (Figura II.1.B).

Turbiedad: La turbiedad se determinó mediante un turbidímetro y por profundidad del disco de Secchi (Figura II.1.C). El análisis comparativo de ambas metodologías permitió comprobar que el disco de Secchi se correlacionó con los valores de turbiedad para las determinaciones del sitio de monitoreo de CE y PD siendo los coeficientes de correlación de Spearman $r_s = -0,747$ ($P < 0,001$; $n=20$) y $r_s = -0,72$ ($P < 0,001$; $n=18$) respectivamente. La mayor transparencia se determinó en el sitio PD con promedios que oscilaron entre 3,78 m en invierno y 2,37 m en primavera que se corresponden con valores de turbiedad de 1,3 y 2,1 NTU respectivamente. Esto puede deberse a que en la zona del Dique, al estar rodeada por las Sierras, el agua se encuentra más quieta con un menor efecto del viento, por lo tanto el material en suspensión puede decantar y así sus aguas se observan con mayor transparencia. Por otro lado, el sitio de monitoreo DLR presentó, durante todo el año la mayor turbidez con valores promedio del disco de Secchi en verano de 0,84 m y 1,08 m en otoño con sus correspondientes determinaciones de turbiedad de 7,85 y 5,58 NTU. Tanto en verano como en primavera se registraron los mayores valores de turbiedad.

Conductividad: Los valores de conductividad fluctuaron entre un mínimo de 53 $\mu\text{S}/\text{cm}$ registrado en el sitio de monitoreo PD, hasta un máximo de 139 $\mu\text{S}/\text{cm}$ medido en el sitio CE. Durante la estación de otoño la conductividad osciló en 70 $\mu\text{S}/\text{cm}$ siendo las determinaciones más bajas registradas a lo largo del año. Por otro lado, los rangos de conductividad más altos fueron medidos en primavera para todos los sitios de monitoreo con medias de 97 $\mu\text{S}/\text{cm}$, sólo en los sitios de monitoreo CE, PD y DLR se superó el valor de 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Figura II.1.E). La prueba de Friedman rechazó la hipótesis nula para conductividad ($P = 0,0469$) por lo tanto existen diferencias significativas entre las estaciones del año. Al realizar el análisis de comparaciones múltiples se obtuvieron diferencias significativas para el par otoño-primavera ($P=0,0108$) e invierno-primavera ($P=0,0328$).

Oxígeno disuelto: Durante todo el año los valores de OD, en las muestras de agua superficial, se mantuvieron en general por encima de 7 mg/L, hallándose valores medios

superiores a 10 mg/L durante el invierno. Los casos en que se determinaron valores entre 2 a 4 mg/L correspondieron a la estación de verano en los sitios CE, PD y DLR (Figura II.1.F). Esto puede deberse a que durante el verano el embalse se encuentra estratificado de manera que en las capas de agua superficial al aumentar la temperatura disminuye la solubilidad del oxígeno, y esto a su vez puede estar favorecido por la mayor actividad bacteriana. Al comparar CE con PD los valores medios hallados para cada estación del año siempre fueron superiores en CE que en PD, debido probablemente a que en el centro del embalse los vientos favorecen las turbulencias y así se ve favorecida la incorporación de oxígeno a nivel superficial, mientras que en la zona del Dique, que se ve protegida de los vientos por las sierras circundantes, predominan las aguas quietas. El análisis de las diferencias de las medias dio significativo ($P < 0,05$) entre las estaciones del año. En este sentido, el análisis de comparaciones múltiples fue significativo para el par: verano-invierno ($P = 0,0174$) y otoño-invierno ($P = 0,0099$).

Carbono orgánico total: Los valores de carbono orgánico total (TOC) presentaron un mínimo de 2,7 mg/L y un máximo de 8,1 mg/L. En todos los sitios de monitoreo se observó que los valores medios en verano fueron, en conjunto, los más elevados, mientras que en invierno las determinaciones de TOC fueron las más bajas, aunque no se pudo conocer la dispersión de datos debido al escaso número de muestras (Figura II-2.A). El análisis estadístico de las medias reveló diferencias significativas entre las estaciones del año ($P < 0,05$). El test *a posteriori* de comparaciones múltiples, mostró diferencias significativas entre verano-invierno y verano-primavera para los datos obtenidos en DLR.

Demanda química de oxígeno: El valor mínimo determinado de la demanda química de oxígeno (DQO) fue 3,7 mg/L y el máximo se halló en 35,5 mg/L. Se observó una gran dispersión de datos tanto espacial (entre los sitios de monitoreo) como temporal (diferentes estaciones) (Figura II-2.B). No se obtuvieron diferencias significativas entre las medias.

Alcalinidad y dureza: Los valores de alcalinidad mostraron un rango de concentración de 34 a 56 mg CaCO₃/L. En función de los rangos de alcalinidad es posible clasificar a las aguas según su capacidad de amortiguación del pH y en función de los valores obtenidos se puede concluir que el agua del embalse se encuentra moderadamente amortiguada (UNESCO/WHO/UNEP, 1996). En cuanto a la dureza, se obtuvieron valores que oscilaron

entre 24 y 38 mg CaCO₃/L. En las Figuras II-2.C-D se presentan los valores de alcalinidad y dureza donde se puede apreciar que ambas presentan el mismo perfil. En todos los sitios de monitoreo se observó que los valores de alcalinidad y dureza presentaron los valores más bajos en verano y otoño, mientras que en primavera se registraron los valores más altos.

Compuestos de fósforo: En el embalse la concentración de fósforo total (PT) mínima y máxima fue de 10 y 103 µg/L respectivamente, hallando el valor más elevado en el sitio DLR. Los valores medios hallados en la estación de verano fueron los más altos registrados en todo el embalse. En el sitio DLR se registraron los valores medios más altos y la mayor dispersión de datos obtenidos tanto en las estaciones de verano (59,3 ± 34 µg/L) como de otoño (56,1 ± 49 µg/L). Estas variaciones en los valores registrados en el sitio DLR es un claro indicador de la procedencia de fuentes antrópicas de fósforo como puede ser la actividad agrícola. Las diferencias entre los sitios de monitoreo fueron significativas y el análisis de comparaciones múltiples resultó significativo para el par: verano-invierno (P=0,0240) y verano-primavera (P=0,0317). Por otro lado, los valores obtenidos del fósforo reactivo soluble (ortofosfato) oscilaron entre mínimo de 10 µg/L y un máximo de 24 µg/L registrado en el sitio PD (Figura II-2.E)

Clorofila-α: Las variaciones halladas en la concentración de clorofila-α fueron muy marcadas tanto en el espacio como en el tiempo con valores que abarcaron el rango desde 1 a 380 µg/L. En general, la dispersión de datos fue mayor en verano y en otoño en todos los sitios de monitoreo, excepto en PD donde no se observaron diferencias entre las medias de los agrupamientos por estación. Durante el otoño se registraron las concentraciones más altas de clorofila-α, siendo el sitio DLR donde se alcanzó el máximo de concentración (Figura II-2.F). Se obtuvieron diferencias significativas entre las medias de los agrupamientos estacionales por cada sitio de monitoreo (P<0,05). Al reagrupar los datos por estación se hallaron diferencias significativas entre el grupo de otoño y primavera.

Compuestos de nitrógeno: En el caso del nitrato (expresado como nitrógeno de nitrato) los valores se hallaron entre 100 y, excepcionalmente, 300 µg/L registrados durante el verano tanto en PD como en DSP. Se puede observar en la Figura II-3.A, que en todos los casos analizados, los rangos se mantuvieron dentro de los mismos valores, aunque las medias de las determinaciones en verano y primavera son levemente superiores.

Los valores de nitritos (expresado como nitrógeno de nitrito) se mantuvieron por debajo del límite de cuantificación de la técnica ($< 6 \mu\text{g/L}$), ocasionalmente en primavera en el sitio PD y DLR se detectaron $9 \mu\text{g/L}$ y en CE alcanzó un valor máximo de $12 \mu\text{g/L}$ (Figura II-3.B)

La concentración de compuestos amoniacales (expresado como nitrógeno de amonio) osciló entre 40 a $120 \mu\text{g/L}$, hallando que un gran número de muestras presentaron determinaciones por debajo del valor de cuantificación ($< 40 \mu\text{g/L}$). Los valores registrados de este parámetro mostraron desvíos con rangos muy variables. En todos los sitios de monitoreo los valores máximos detectados fueron registrados en primavera, en particular en el sitio de monitoreo PD los valores fueron elevados casi todo el año. No se hallaron diferencias significativas entre los sitios de monitoreo (Figura II-3.C).

II.3.1.2 Recuento de bacterias heterótrofas

La variación espacio-temporal de los recuentos obtenidos de las bacterias heterótrofas se presenta en Boxplot en la Figura II-4. Para este análisis se contaron con 19 determinaciones que correspondieron a los monitoreos realizados entre noviembre de 2008 a diciembre de 2011.

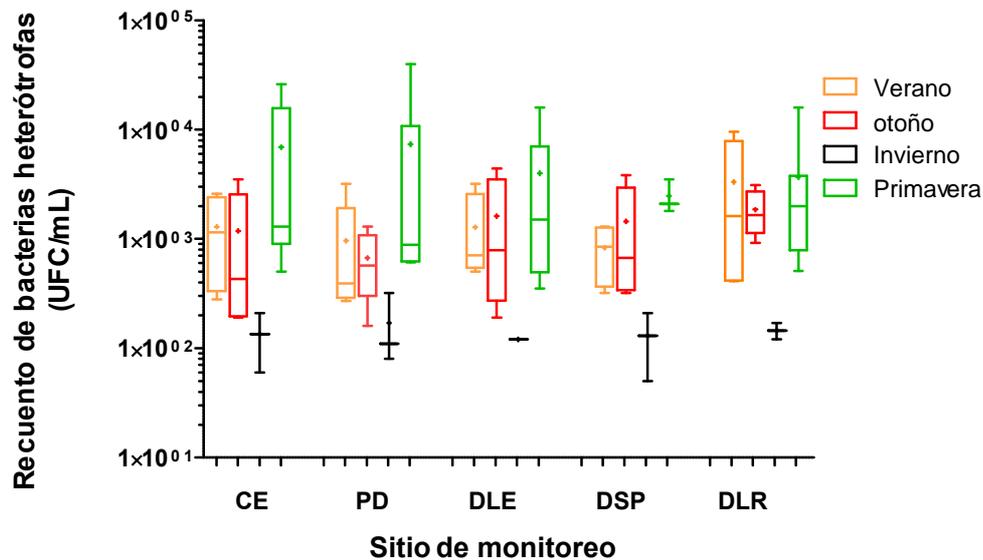


Figura II-4. Variación espacio-temporal de los recuentos de las bacterias heterótrofas. Sitios de monitoreo: Desembocadura de los ríos Los Reartes (DLR), Los Espinillos (DLE), San Pedro (DSP), y centro (CE) y pared del dique del embalse (PD).

El número de bacterias heterótrofas oscilaron entre $5,0 \times 10^1$ y $3,2 \times 10^2$ bacterias/mL durante los meses de invierno registrando los recuentos más elevados durante la estación primavera con un máximo de $4,0 \times 10^4$ bacterias/mL en el sitio de monitoreo PD. Asimismo en el sitio DLR los valores medios de los recuentos tanto de verano como otoño fueron los más altos en comparación con el resto del embalse ($1,5 \times 10^3$ y $1,7 \times 10^3$ bacterias/mL, respectivamente). El número de bacterias heterótrofas más alto se registró en las muestras extraídas durante la primavera en el centro del embalse (CE) con una media de $2,6 \times 10^3$ bacterias/mL. En general se obtuvo que las bacterias heterótrofas se hallaron en el orden de 1×10^3 bacterias/mL, lo cual coincide con otros valores reportados en diferentes trabajos para cuerpos de agua lóticos (Margalef, 1982; Harsha *et al.*, 2007; Wang, 2008). El seguimiento de las bacterias heterótrofas en ambientes acuáticos permite caracterizar los cuerpos de agua asociados a las fluctuaciones en la carga de materia orgánica (Margalef, 1982; Eiler *et al.*, 2003)

II.3.1.3 Enumeración de coliformes termotolerantes y Escherichia coli

Para el análisis del estado sanitario de las aguas del embalse se evaluaron los grupos coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* (*E. coli*) (Figura II-5) por un lado y por otro lado estreptococos fecales y enterococos (Figura II-6). Los grupos indicadores de contaminación fecal se presentan discriminados por sitio en función de las fechas de monitoreo.

Respuesta de la Comunidad Bacteriana presente en el Embalse Los Molinos (Córdoba, Argentina) expuesta a Pesticidas

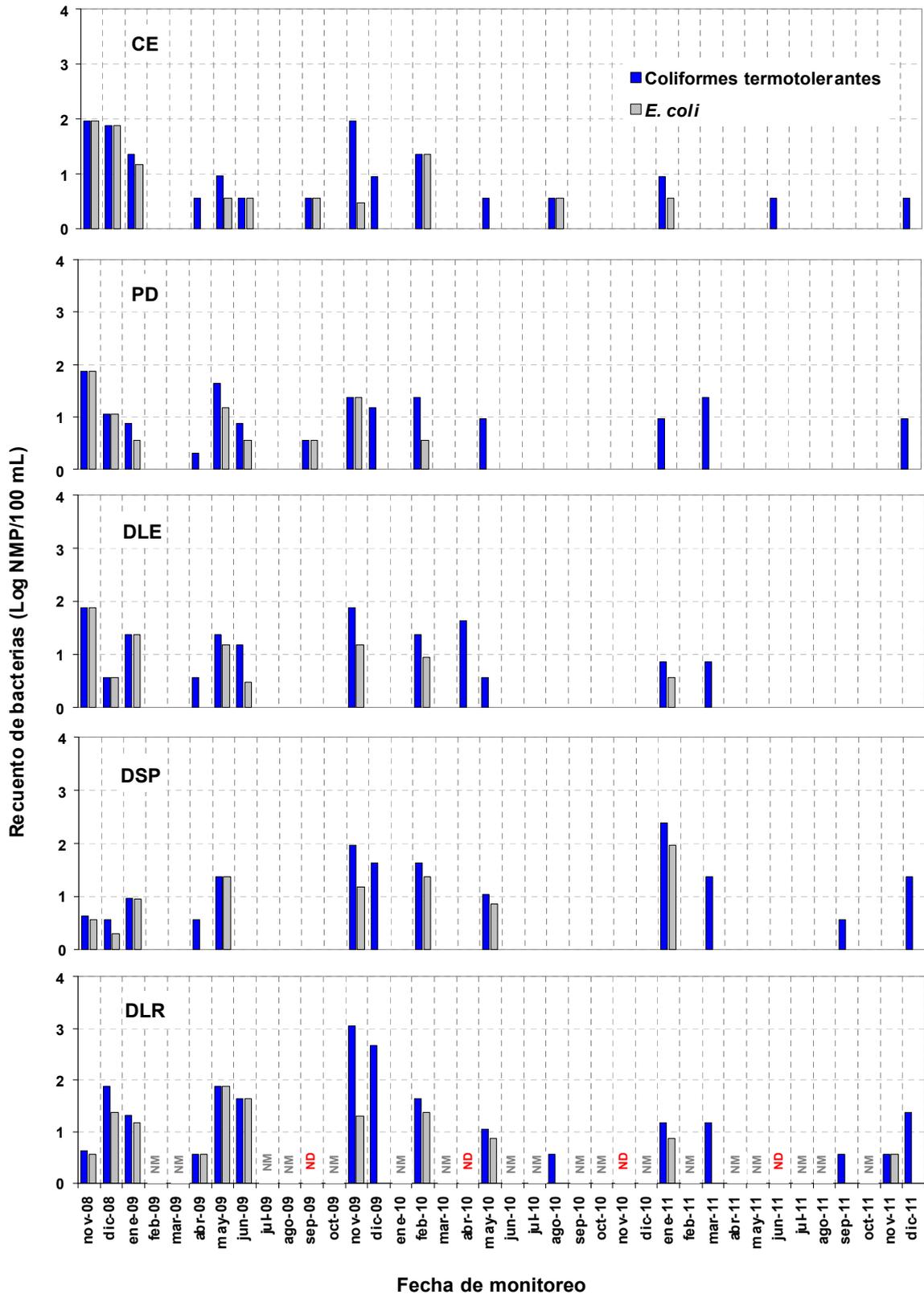


Figura II-5. Comparación de los recuentos de bacterias coliformes termotolerantes y *E. coli*. Se presentan los gráficos por cada sitio de monitoreo: centro (CE) y pared del dique del embalse (PD); Desembocadura de Los Espinillos (DLE), San Pedro (DSP) y Los Reartes (DLR). Valores hallados por debajo del límite de detección de la técnica (No detectado-ND). Fechas no monitoreadas (NM). Los recuentos se presentan en escala logarítmica

En la mayoría de las muestras, las determinaciones de coliformes termotolerantes se hallaron por debajo de 100 NMP/100 mL (equivalente a 2 respecto de su logaritmo). De todas las determinaciones, los recuentos de bacterias más altos se registraron durante los meses de verano y primavera. Cabe destacar que sólo en los sitios de monitoreo de DSP y DLR se registraron valores extremos. En DSP los coliformes termotolerantes alcanzaron el número más elevado de 240 NMP/100 mL en la muestra correspondiente a enero de 2011. Por otro lado, en el sitio DLR, en muestras de mayo 2010 y junio 2011, el número de bacterias alcanzó un máximo de 1100 y 460 NMP/100 mL respectivamente. Sólo estas muestras superaron el nivel propuesto por el EPA (2002) para la calidad de aguas para uso recreacional considerando al grupo de coliformes termotolerantes (< 200 NMP/ 100 mL).

La concentración de *Escherichia coli* presentó un perfil similar a coliformes termotolerantes siendo el valor más elevado 240 *E. coli*/100mL registrados en sólo dos oportunidades en el sitio DLR y DSP. Siendo estas determinaciones las únicas que superaron el nivel guía establecido por la Secretaria de Recursos Hídricos de la Nación de 235 NMP/100 mL, lo cual representa un riesgo para la salud del hombre por exposición por contacto primario como la natación. En general los valores no superaron los 100 *E. coli*/100 mL.

Del total de 72 determinaciones bacteriológicas en sólo 27 de ellas (37,5%) la relación entre *E. coli*/coliformes termotolerantes fue mayor a 0,9, indicando una dominancia de *E. coli* respecto del total de las bacterias pertenecientes al grupo de coliformes termotolerantes. Además, este resultado permitió inferir que el origen de la contaminación fue predominantemente de origen fecal.

II.3.1.4 Enumeración de estreptococos fecales y enterococos

Con relación a las determinaciones de estreptococos fecales y enterococos se obtuvieron una gran variabilidad en las concentraciones tanto espacial como temporal. En la Figura II-6 se presentan las determinaciones de estreptococos fecales y enterococos analizados en los distintos sitios de monitoreo.

Respuesta de la Comunidad Bacteriana presente en el Embalse Los Molinos (Córdoba, Argentina) expuesta a Pesticidas

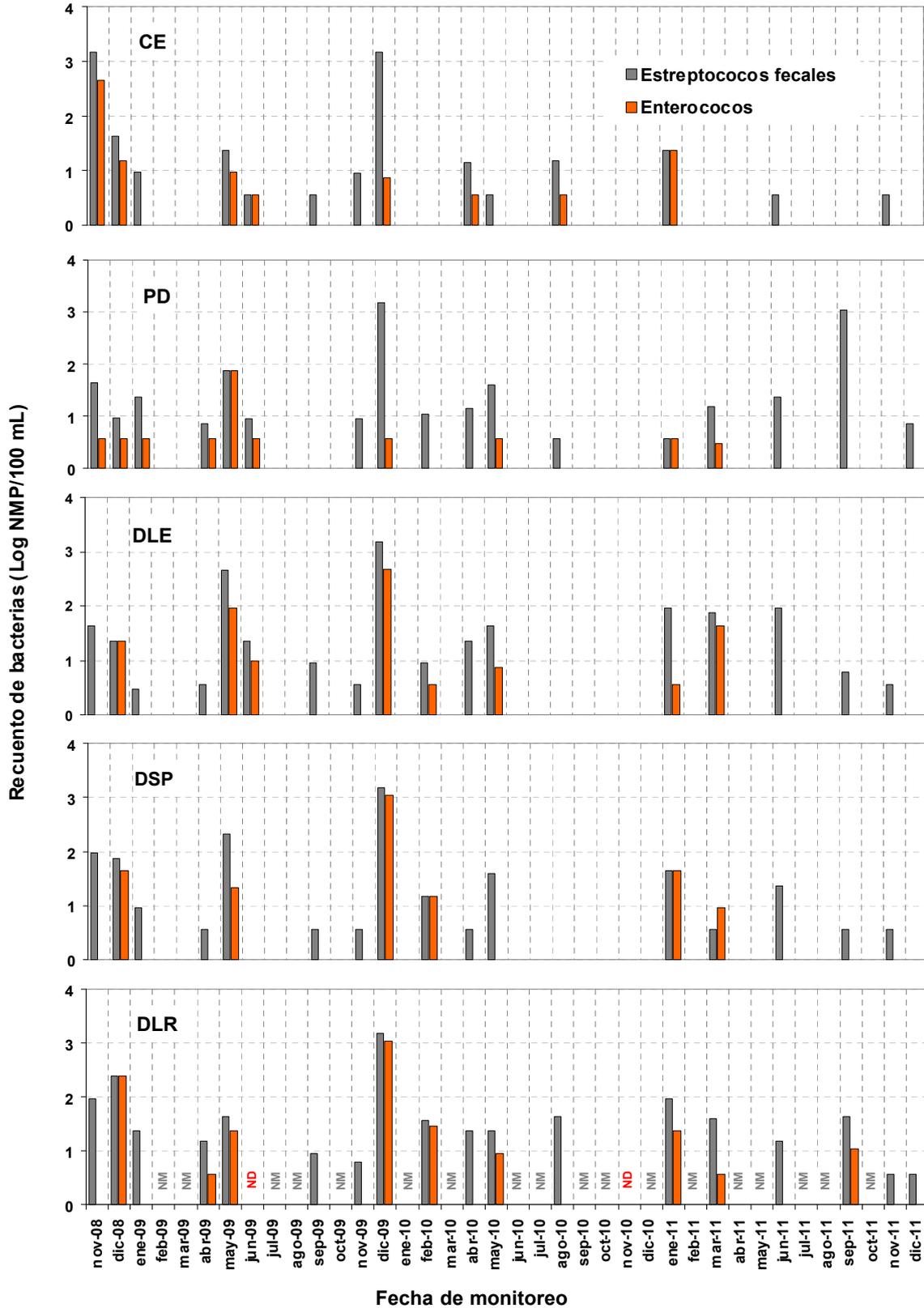


Figura II-6. Comparación entre los recuentos de estreptococos fecales y enterococos. Sitios de monitoreo: centro (CE) y pared del dique del embalse (PD); Desembocadura de Los Espinillos (DLE), San Pedro (DSP) y Los Reartes (DLR). Valores hallados por debajo del límite de detección de la técnica (No detectado-ND). Fechas no monitoreadas (NM). Los recuentos se presentan en escala logarítmica.

El recuento más alto de los estreptococos fecales fue de 1500 NMP/100 mL (equivalente a 3,17 del valor logaritmado), en particular en las muestras extraídas en diciembre de 2009 donde se obtuvieron estos valores en forma simultánea en todo el embalse. En la Tabla II.A.3 se puede apreciar que las medias aritméticas de los estreptococos fecales mostraron los valores más altos en casi todos los puntos del embalse (79,3; 22,8; 46,1; 29,3 y 56,4 estreptococos fecales/100mL en los sitios CE, PD, DEL, DSP y DLR respectivamente). En el sitio de DLR se registraron las concentraciones más elevadas a lo largo del año.

Los enterococos se determinaron en un menor número de muestras. Los enterococos se confirmaron en el 42% de las muestras analizadas en el sitio CE, 63% en PD, 58% en DEL, sólo 47% en DSP y 67% en DLR. Las concentraciones más altas (1100 NMP/100 mL) correspondieron a la muestras extraídas en diciembre de 2009, tanto en el sitio DSP como DLR. Teniendo en consideración los niveles guías establecidos por la Secretaria de Recursos Hídricos de la Nación para calidad de agua contemplando una exposición por contacto primario (natación), la concentración de enterococos debe hallarse por debajo de 61 NMP/100 mL mientras que para contacto secundario (actividades acuáticas sin inmersión) el límite es de 89 NMP/100 mL. De aquellas muestras positivas para enterococos sólo dos determinaciones superaron los límites para estos microorganismos considerando las restricciones de contacto primario y secundario.

II.3.2 Análisis de correlación de las variables fisicoquímicas y bacteriológicas

Se realizó un análisis de correlación de Spearman por rangos de los parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos. El análisis se realizó tomando todos los valores obtenidos de los diferentes sitios de monitoreo. En la Tabla II.A.1 se resume la correlación entre las distintas variables fisicoquímicas y bacteriológicas con su coeficiente de correlación de Spearman (r_s) y su P-valor.

Del análisis de correlación permitió confirmar un total de 51 pares de parámetros asociados. En el caso de Secchi se obtuvo una fuerte correlación con signo negativo tanto con turbiedad ($r_s = -0,789$; $P < 0,001$) como PT ($r_s = -0,651$; $P < 0,001$), TOC ($r_s = -0,584$; $P < 0,001$) y clorofila- α ($r_s = -0,630$; $P < 0,001$), aunque se determinó una relación débil con *E. coli* ($r_s = -0,248$; $P = 0,043$). En relación con la turbiedad, se determinó que presenta una fuerte asociación con PT, TOC y clorofila- α ($r_s = 0,619$; $0,534$ y $0,627$ respectivamente). Por otro lado PT, TOC y clorofila- α se hallaron fuertemente relacionados entre si. Esto indicaría que en el embalse Los Molinos el sustrato limitante para el crecimiento de las

algas esta determinado por la concentración de fósforo total y no por nitratos. Al aumentar la biomasa de algas se incrementó la materia orgánica lo que explica que el aumento de la clorofila este asociado con el incremento de carbono orgánico total (TOC). Por otro lado, el amonio se halló correlacionado negativamente con clorofila- α ($r_s = -0,451$) y con la turbiedad ($r_s = -0,285$).

La conductividad mostró una fuerte asociación positiva con la dureza ($r_s = 0,461$), así como la alcalinidad con la dureza ($r_s = 0,745$). También variaron conjuntamente la conductividad con los nitratos ($r_s = 0,399$). Este resultado es consistente con el hecho que la alcalinidad y la dureza son dos parámetros muy asociados entre sí ya que determinan la composición de carbonatos. Además, el aumento de sales carbonatadas se ve reflejado en un aumento de la conductividad.

Es interesante señalar que hay dos grupos de parámetros fuertemente interrelacionados entre si. Estos grupos son, por un lado la alcalinidad, la dureza y los nitratos, y por el otro lado, PT, TOC y clorofila.

En el caso de la temperatura del agua se correlacionó negativamente con la concentración del oxígeno disuelto (OD) ($r_s = -0,327$). Este resultado es perfectamente consistente con el hecho que al incrementarse la temperatura del agua disminuye la solubilidad del oxígeno. Además, la temperatura se halló asociada a la concentración de TOC ($r_s = 0,491$) y esto podría estar relacionado a que durante los meses estivales, cuando se registran las temperaturas más elevadas, se incrementa el material en suspensión como la concentración de algas.

Las bacterias heterótrofas presentaron una correlación significativa con los recuentos de coliformes termotolerantes ($r_s = 0,431$; $P < 0,001$), *E. coli* ($r_s = 0,331$; $P = 0,006$), estreptococos fecales ($r_s = 0,267$; $P = 0,029$) y enterococos ($r_s = 0,299$; $P = 0,014$). Los recuentos de coliformes termotolerantes tuvieron una fuerte asociación positiva con *E. coli* ($r_s = 0,759$; $P < 0,001$), así como también los estreptococos fecales y enterococos ($r_s = 0,626$; $P < 0,001$). Es interesante destacar que también se hallaron correlacionadas moderadamente *E. coli* y enterococos ($r_s = 0,339$; $P = 0,005$). El hecho de hallar que los indicadores bacterianos de contaminación fecal se encuentren relacionados linealmente permite identificar el mismo origen de contaminación.

De la matriz de correlación entre variables fisicoquímicas y bacteriológicas se observó una correlación débil pero con un P-valor altamente significativo ($P < 0,05$) entre las bacterias heterótrofas y la conductividad ($r_s = -0,298$; $P = 0,014$). Por su parte, el grupo coliformes termotolerantes también mostró una asociación débil con el carbono orgánico

total (TOC) ($r_s = 0,255$; $P=0,036$), con la temperatura ($r_s = 0,392$; $P=0,001$) y con la turbiedad ($r_s = 0,251$; $P=0,040$). En el caso de *E. coli* mostró una asociación débil con signo negativo, con Secchi ($r_s = -0,248$; $P=0,043$) y una asociación positiva con clorofila- α ($r_s = 0,268$; $P=0,029$).

II.3.3 Determinación del estado trófico en el embalse Los Molinos

En función de los valores determinados en los monitoreos de los parámetros fisicoquímicos, se utilizaron los valores medios de fósforo total (PT), clorofila- α (clor) y profundidad de disco de Secchi (DS) para la determinación del estado trófico de las aguas del embalse Los Molinos. Se calculó el índice de trofia según la OECD (1982) (Tabla II-3) y el Índice de Estado Trófico (TSI) de Carlson (1977) (Tabla II-4) para los diferentes sitios de monitoreo. Ambas determinaciones utilizan los valores promedios anuales de los diferentes parámetros.

Tabla II-3. Valoración de estado trófico según la OECD (1982). Sitios de monitoreo en el embalse Los Molinos: desembocadura del río Los Reartes (DLR), desembocadura del río Los Espinillos (DLE), desembocadura del río San Pedro (DSP), Presa del Dique (PD) y Centro del embalse (CE).

SITIOS DE MONITOREO	MEDIA ANUAL PT (μ/g)	MEDIA ANUAL Clorofila- α (μ/g)	MAXIMO ANUAL Clorofila- α (μ/g)	MEDIA ANUAL Disco de Secchi (m)	MINIMO ANUAL Disco de Secchi (m)	ESTADO TRÓFICO
Desembocadura del río Los Reartes (DLR)	45,1	34,8	380,0	1,0	0,3	HIPEREUTRÓFICO
Desembocadura del río San Pedro (DSP)	25,7	8,8	57,0	1,9	1,0	MESOTRÓFICO / EUTRÓFICO
Desembocadura del río Los Espinillos (DLE)	42,2	22,6	149,0	1,8	1,0	EUTRÓFICO / HIPEREUTRÓFICO
Presa del Dique (PD)	22,4	4,3	23,0	3,0	1,2	MESOTRÓFICO
Centro del embalse (CE)	29,1	15,0	87,0	1,8	0,8	MESOTRÓFICO / EUTRÓFICO

Tabla II-4. Índice de Estado Trófico (TSI) de Carlson (1977). Sitios de monitoreo en el embalse Los Molinos: desembocadura del río Los Reartes (DLR), desembocadura del río Los Espinillos (DLE), desembocadura del río San Pedro (DSP), Presa del Dique (PD) y Centro del embalse (CE).

SITIOS DE MONITOREO	TSI PT	TSI Clorofila- α	TSI Disco de Secchi	MEDIA TSI	ESTADO TRÓFICO
Desembocadura del río Los Reartes (DLR)	59	65	60	62	EUTRÓFICO
Desembocadura del río San Pedro (DSP)	51	52	51	51	MESOTRÓFICO
Desembocadura del río Los Espinillos (DLE)	58	61	52	57	EUTRÓFICO
Presa del Dique (PD)	49	45	44	46	MESOTRÓFICO
Centro del embalse (CE)	53	57	52	54	MESOTRÓFICO

En base a la clasificación trófica de límites fijos propuesta por la OCDE y de acuerdo con los valores del índice de Carlson se comprueba que hubo concordancia entre ambas determinaciones para cada sitio de monitoreo del embalse Los Molinos. Se determinó que las condiciones que predominan en los sitios DLR y DLE es eutrófico con tendencia a la hipereutrofía y en menor medida el sitio DSP, donde dependiendo de cual índice se utilice puede clasificarse como mesotrófico. Tanto en los sitios del centro (CE) como la presa del dique (PD) se determinaron condiciones mesotróficas.

II.4- DISCUSIÓN

Como resultado del análisis de los parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos de las muestras de las aguas del embalse Los Molinos se obtuvieron grandes variaciones temporales y estacionales que permitieron identificar grupos de variables asociadas en cada periodo.

El oxígeno disuelto mostró una gran dispersión desde valores de 2 hasta valores 12 mg/L. Excepto en los sitios de monitoreo CE y PD se registraron durante el verano valores por debajo de 4 mg/L. Las bajas concentraciones de OD en los cuerpos de agua indican niveles altos de contaminación y puede causar efectos negativos en los organismos acuáticos y afectar directamente al ecosistema (Cossavella et al., 20001; Ruibal Conti *et al.*, 2006; Hacioglu y Dulger, 2009). Concentraciones por debajo de 2 mg/L de OD pueden causar mortandad masiva de peces, tal como se confirmó en varias oportunidades en el embalse San Roque (Córdoba) (Ruibal Conti, 1997; Bustamante *et al.*, 2002).

Durante el periodo de estudio se confirmó una clara relación de la turbiedad con la concentración de clorofila- α , con el carbono orgánico total (TOC) y con la concentración de fósforo total (PT). Que estos parámetros se encuentren correlacionados resulta intuitivos ya que al incrementarse la biomasa de algas se incrementa la turbiedad así como la materia orgánica en suspensión producto del aumento de la biomasa, lo cual se expresa finalmente como un aumento del carbono orgánico total (TOC).

Tal como lo describen Pasquini y col. (2004) la alcalinidad moderada de las aguas superficiales que llegan al embalse Los Molinos es originada principalmente por la meteorización de los granitos de la roca madre y las clasifican en general como bicarbonatadas mixtas, siendo su composición dominada por HCO_3^- , luego por $\text{Cl}^- + \text{SO}_4^{2-}$ y $\text{Na}^+ + \text{Ca}^{2+}$ y en menor medida por $\text{K}^+ + \text{Mg}^{2+}$. Este carbonato que pasa al agua aumenta de

forma natural el pH, ya que hidroliza parcialmente al agua dando OH⁻, lo cual lo convierte en una base moderadamente fuerte. Como se mencionó anteriormente, el pH característico de estas aguas oscila entre 7 y 9 predominando la condición alcalina (Ambosino, 2000; Cossavella, 2002; Bazán, 2005).

En el embalse Los Molinos se destacó que el principal aporte de fósforo proviene principalmente de las subcuencas de los ríos Los Reartes y Los Espinillos, lo cual permite asociarlo directamente con el uso agropecuario en la cuenca. Más aún, la concentración de PT se incrementó durante el periodo estival sugiriendo que son el aumento de las lluvias, y en consecuencia el caudal de arrastre, los medios para vehiculizar este fósforo. Resultados similares fueron descriptos por Cossavella (2003) quien determinó que las cargas anuales de fósforo más importante que llegan al embalse provienen de la actividad agrícola y representan el 63% del total anual.

Por otra parte, la biomasa de algas puede variar no sólo estacionalmente, sino que incluso diariamente y esas variaciones también dependen de la profundidad del cuerpo de agua (Margalef, 1982). Aquellos cuerpos de agua con bajos niveles de nutrientes como los lagos oligotróficos presentan bajas concentraciones de clorofila (<2,5 µg/L) mientras que las aguas con alto contenido de nutrientes, permiten el sustento de una biomasa algal mayor, con concentraciones de clorofila de 5 a 140 µg/L o incluso con valores mayores a 300 µg/L condiciones estas que clasifican a las aguas como eutróficas. La concentración máxima de clorofila-α detectada en el embalse Los Molinos fue de 380 µg/L determinado en el sitio DLR, el cual al ser poco profundo esta en contacto con los sedimentos, generalmente reservorios de altas concentraciones de compuestos orgánicos y nutrientes que permitirían el desarrollo algal. Sin embargo, se ha registrado en todos los sitios de monitoreo, tanto en la estación de verano como de otoño, que las concentraciones de clorofila-α se hallaron por encima de 10 µg/L, excepto en el sitio de monitoreo PD que presentó valores bajos durante todo el año con valores máximos de 20 µg/L.

El nitrato se incrementó marcadamente en las estaciones de verano y primavera pero nunca superó la concentración de 0,3 mg N-NO₃⁻/L durante los monitoreos de 2010 a 2011. Las concentraciones de nitratos en aguas superficiales dulces no contaminadas, expresadas en términos de nitrógeno (N-NO₃⁻), se mantienen en el rango de 0,1 a 1 mg/L. Las concentraciones de N-NO₃⁻ mayores a 1 mg/L son indicadoras de múltiples fuentes de contaminación por actividades antrópicas. La Secretaria de Recursos Hídricos de la Nación (2003) estableció como nivel guía de calidad para nitratos en la fuente de provisión de

agua para consumo humano una concentración $<10 \text{ mg N-NO}_3^-/\text{L}$. En cuerpos de agua lóticos concentraciones que exceden los $0,2 \text{ mg N-NO}_3^-/\text{L}$ suelen estimular el desarrollo de las algas y desencadenar los procesos de eutroficación (Ryding y Rast, 1993; Carpenter *et al.*, 1998).

En el caso del nitrito, el Decreto 831 de Ley 24.051 de Residuos peligrosos de la Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable (1993), establece que su concentración debe estar por debajo de $60 \text{ } \mu\text{g N-NO}_2^-/\text{L}$ para asegurar la calidad de agua dulce superficial para protección de vida acuática. Debido a que durante los monitoreos en el embalse la concentración de nitrito se mantuvo por debajo del límite de detección de $6 \text{ } \mu\text{g/L}$ y que excepcionalmente llegó a $12 \text{ } \mu\text{g/L}$ en primavera (Figura II-3), puede concluirse que el agua mantiene una buena calidad y que el incremento puede estar vinculado al arrastre superficial desde la cuenca al comienzo de la época de lluvias.

Respecto del amonio, la concentración más elevada registrada fue de $120 \text{ } \mu\text{g/L}$ durante la primavera. Los niveles guía de calidad de agua para protección de vida acuática establece un valor límite superior de $1370 \text{ } \mu\text{g N-NH}_4^+/\text{L}$ (Decreto 831-Ley 24.051). La determinación de amonio en agua a nivel superficial es un buen indicador de contaminación procedente de la actividad agrícola por arrastre de los fertilizantes y pesticidas, pero también puede indicar una fuente de contaminación por líquidos residuales (SRHN, 2003). De hecho, en la subcuenca del Río Los Reartes donde predomina la actividad agrícola, uno de los fertilizantes frecuentemente utilizado es el fosfato de amonio (declarado en las Fichas fitosanitarias de la Comuna Villa Parque Los Reartes).

Tomando en cuenta la ubicación del sitio de monitoreo de PD, donde se registra la mayor profundidad del embalse, al estar protegido por las sierras, evita turbulencia provocada por el viento lo que puede explicar la escasa variabilidad y mayor estabilidad que presentan algunos parámetros fisicoquímicos como PT, TOC y clorofila ya que las condiciones locales facilitarían la decantación del material en suspensión y favorecerán la transparencia, esto se observa con los mayores valores de Secchi obtenidos durante todo el año en esta zona.

En el caso de las determinaciones bacteriológicas, los recuentos de las bacterias heterótrofas se relacionaron con la temperatura, si bien no hubo una correlación lineal significativa según el análisis de correlación de Spearman, sí se registraron recuentos mayores durante los meses estivales, en particular durante primavera. Esto se debe a que el crecimiento bacteriano no sólo está influenciado por la temperatura, sino también por

otras factores como la disponibilidad de nutrientes, oxígeno disuelto, entre otros (Atlas y Bartha, 2002).

Se encontró una fuerte correlación entre coliformes termotolerantes y *E. coli* ($r_s = 0,759$) (Tabla II.A.5) lo que es consistente con el hecho de que *E. coli* es la bacteria que domina el grupo de los coliformes fecales. En relación con los datos obtenidos en este trabajo, sólo el 37% de las muestras analizadas de *E. coli* domina el grupo de coliformes en un porcentaje mayor al 90%. Por otro lado, los coliformes termotolerantes presentaron una correlación moderada con la temperatura ($r_s = 0,392$) y con TOC ($r_s = 0,255$). En relación con *E. coli* se encontró una asociación débil, con signo negativo, con disco de Secchi ($r_s = -0,248$; $P=0,043$) y una asociación positiva con clorofila- α ($r_s = 0,268$; $P=0,029$). En general, estas asociaciones halladas entre los parámetros fisicoquímicos y los recuentos de las bacterias indicadoras de contaminación fecal, describen un mismo escenario en el cual el material en suspensión, expresado como TOC y turbiedad, provendría del arrastre superficial provocado por las lluvias. Además, se puede mencionar que tanto los coliformes termotolerantes como *E. coli* pueden prevalecer por más tiempo en aguas turbias adsorbidos al material particulado, tal como se menciona Rasmussen y Ziegler (2003) quienes destacan que las bacterias *E. coli* pueden sobrevivir por largos periodos en suelos.

En suma, si bien las diferencias en las asociaciones halladas entre coliformes y *E. coli* pueden deberse fundamentalmente a diferencias en las capacidades de sobrevivir una vez que llegan a los cuerpos de agua, ello dependerá a su vez de las características físicoquímicas del agua (Folabella *et al.*, 2006; Rasmussen y Ziegler, 2003).

Todos los organismos indicadores de contaminación fecal considerados en éste trabajo presentaron valores más elevados a la altura de DLR constituyendo así el sitio de mayor riesgo de exposición a aguas contaminadas. Asimismo, se detectaron recuentos altos en el sitio DSP debido a las descargas cloacales de los asentamientos humanos ubicados en la zona con mayor crecimiento urbano. Estas determinaciones se registraron fundamentalmente en los meses estivales cuando predominan las lluvias, en particular primavera. Diversos autores han destacado que las precipitaciones, al incrementar los caudales de los ríos y lavado superficial, incrementan los valores detectados de los indicadores de contaminación fecal en los cuerpos de agua receptores (Chiroles Rubalcaba *et al.*, 2007). Si como también otros factores como la mayor afluencia turística en la época estival podría contribuir a la mayor detección de indicadores de contaminación fecal (Rodríguez *et al.*, 2002, Cossavella, 2003).

El hecho de encontrar niveles tan altos de bacterias pertenecientes al grupo de estreptococos fecales y enterococos tiene correlación con su capacidad de sobrevivir en el ambiente. Diferentes autores destacan la utilidad de éste grupo como indicador de contaminación fecal (Suárez Pita, 2002; Kizelman *et al.*, 2003). En este sentido, es importante considerar que la variabilidad de las condiciones ambientales puede afectar en distinto grado la supervivencia de los grupos bacterianos (Barrell, *et al.*, 2000). En la actualidad existe una tendencia a utilizar a *E. coli* y a los enterococos como los indicadores más adecuados para la determinación de la calidad del agua, ya que su concentración en el ambiente se correlaciona mejor con la incidencia de enfermedades de origen hídrico (Folabella *et al.*, 2006). En el embalse Los Molinos tanto *E. coli* como enterococos son grupos que se encuentran correlacionados ($r_s = 0,339$) lo cual sugiere el mismo origen. Cabe destacar que enterococos fue detectado en un número mayor de monitoreos con recuentos elevados, lo cual permite considerar sitios en riesgo que escapan a la evaluación de *E. coli*, en especial en aquellos eventos en que se detectaron los enterococos por encima de los niveles guía establecidos para aguas recreacionales.

El análisis espacio-temporal de cada grupo indicador de contaminación fecal permitió discriminar entre las diferentes tasas de supervivencia de cada grupo, ya que las bacterias intestinales no son capaces de sobrevivir en el agua por tiempos prolongados, pero también permite evaluar su dispersión en el ambiente y detectar si existe continuidad en las descargas o fuentes de contaminación (Nuzzi y Buhrans, 1997; Rivera *et al.*, 2010). Tal fue el caso del análisis realizado en esta Tesis donde de la comparación de los recuentos de *E. coli* y enterococos, surgió que ambas determinaciones fueron complementarias respecto de la contaminación de origen cloacal, de manera que ofrecieron en conjunto un escenario real de contaminación y de riesgo para la salud del hombre, así como buenos estimadores de la calidad higiénica del agua (Folabella *et al.*, 2006).

A pesar de que sigue siendo la eutroficación un término difícil de definir de manera precisa ya que una descripción de la naturaleza trófica de cualquier lago, río, embalse o estuario se hace generalmente con referencia a una condición previa o a un estado de referencia de menor concentración de nutrientes, es un hecho que la eutroficación de un sistema acuático promueve condiciones indeseables desde muchos puntos de vista: estético, turístico, ecológico y de gestión de las aguas (Pérez *et al.*, 1999)

Desde una perspectiva ecológica general, la eutroficación de lagos y embalses se concibe como un aspecto de la respuesta de los ecosistemas a fuerzas que no son

habituales y/o de origen natural. Se considera de esta manera que el sistema acuático se encuentra bajo una condición de estrés ambiental donde el ecosistema modifica su funcionamiento, acelerando determinados procesos (Pérez *et al.*, 1999; Cossavella, 2003; Drovandi *et al.*, 2005)

Puede destacarse que mediante el empleo de dos cálculos de índices de estado trófico (OECD, 1982 y Carlson, 1977), que el embalse Los Molinos oscila entre un estado mesotrófico a eutrófico dependiendo de los sitios de monitoreo. En este sentido cabe señalar que la condición eutrófica predominó en las tres desembocaduras, probablemente en parte por las bajas profundidades así como también por el aporte de nutrientes de la cuenca de drenaje, caracterizados por altas cargas de fósforo y nitrógeno que en consecuencia incrementan también las floraciones algales, aumentando así la turbidez (Cossavella, 2003; Bazán *et al.*, 2004; Corral *et al.*, 2004).

II.5- CONCLUSIONES

En este trabajo se pudo concluir que la mayor variabilidad ocurre en la zona de la desembocadura del río Los Reartes (DLR) donde predominaron las cargas más elevadas de fósforo, clorofila- α , turbiedad y concentraciones de bacterias. La asociación de estos parámetros puede deberse a que el sitio de monitoreo DLR recibe el caudal procedente del río Los Reartes el cual atraviesa la subcuenca con mayor actividad agrícola y ganadera.

Cabe destacar aquí que los resultados del presente trabajo constituyen un aporte al conocimiento del comportamiento de diferentes indicadores de contaminación fecal, en especial de los estreptococos fecales y los enterococos que pueden incluirse como parte del plan de monitoreos mensuales que viene realizando diferentes entidades públicas y privadas.

Se pudo comprobar que la calidad sanitaria de las aguas del embalse en general presentó una calidad aceptable, de acuerdo con la legislación vigente, aunque se detectaron eventos esporádicos de concentraciones altas de bacterias indicadores de contaminación fecal con valores que superaron los límites guía y no resultaron aptas para uso recreacional, en especial en las costas de DLR.

Como resultado de los monitoreos se halló que los valores de los parámetros coincidieron con los valores previamente publicados por Cossavella (2003), Bazán y col. (2005) y Corral y col (2004) para las aguas superficiales del embalse Los Molinos. Estos resultados permitieron comprobar que la calidad del agua del embalse permanece hace

más de una década bajo condiciones meso-eutróficas y avanza hacia condiciones hipereutróficas debido al deterioro que causa la presencia más frecuente de floraciones algales (Mancini *et al.*, 2011). Cabe aclarar que estas condiciones de deterioro son marcadas en las zonas del perilago.

II.6 TABLAS y FIGURAS COMPLEMENTARIAS

II.6 A. Análisis de la calidad de agua del embalse Los Molinos

Tabla II.6.A.1. Cálculo de la media muestral, la mediana muestral, valores mínimos- máximos y desvíos estándares (DE) de los parámetros físicos registrados durante los monitoreos del periodo 2010-2011 agrupados por estación del año (verano, otoño, invierno y primavera)

		SITIO DE MONITOREO																																
		Centro del Embalse (CE)						Pared del Dique (PD)						Desembocadura del río Los Espinillos (OLE)						Desembocadura del río San Pedro (DSP)						Desembocadura del río Los Reartes (DIR)								
ESTACIÓN DEL AÑO	N° de muestras	Verano		Otoño		Invierno		Primavera		Verano		Otoño		Invierno		Primavera		Verano		Otoño		Invierno		Primavera		Verano		Otoño		Invierno		Primavera		
		6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6				
Temperatura del Agua (°C)	Meda	23,7	17,2	9,9	18,7	23,6	17,5	12,2	19,8	24,3	17,5	9,4	19,7	23,9	17,5	10,6	18,9	20,3	17,3	17,3	17,3	17,3	17,3	17,3	17,3	17,3	17,3	17,3	17,3	17,3	17,3	17,3	17,3	17,3
	Mediana	23,6	16,9	9,9	17,7	23,8	17,4	10,7	19,8	24,1	16,3	19,7	23,7	23,7	17,5	18,5	18,5	23,2	17,6	17,6	17,6	17,6	17,6	17,6	17,6	17,6	17,6	17,6	17,6	17,6	17,6	17,6	17,6	
	Mínimo	21,7	13,5	9,4	16,1	22,1	14,0	10,7	17,1	23,4	13,7	16,8	23,0	23,0	14,3	16,1	16,1	9,8	13,3	13,3	13,3	13,3	13,3	13,3	13,3	13,3	13,3	13,3	13,3	13,3	13,3	13,3	13,3	
	Máximo	25,3	20,5	10,4	22,1	24,6	20,5	15,9	23,2	25,1	20,7	22,7	24,6	20,5	22,8	22,8	22,8	25,1	20,7	20,7	20,7	20,7	20,7	20,7	20,7	20,7	20,7	20,7	20,7	20,7	20,7	20,7	20,7	
	DE	1,2	2,7	0,7	2,7	0,8	2,6	3,0	2,3	0,7	3,0	2,4	0,7	2,4	3,4	3,4	3,4	5,7	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	
Disco de Secchi (m)	Meda	1,7	1,8	1,3	2,4	2,7	3,1	3,8	2,4	1,5	1,5	2,3	1,8	1,6	1,9	1,5	2,6	0,8	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	
	Mediana	1,9	1,8	1,5	2,5	2,6	3,5	3,3	2,4	1,8	1,5	1,8	1,8	1,5	1,8	1,5	2,5	0,9	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	
	Mínimo	1,0	1,5	0,8	1,7	2,0	1,4	3,3	1,2	1,0	1,3	1,3	1,3	1,0	1,5	1,3	2,3	0,4	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	
	Máximo	2,5	2,3	2,3	3,3	4,5	6,3	5,1	3,6	2,3	1,8	2,8	2,8	2,5	2,5	3,3	3,3	1,5	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3		
	DE	0,6	0,4	1,1	0,6	0,9	1,9	1,1	0,9	0,5	0,3	0,6	0,6	0,6	0,4	0,5	0,5	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	
Turbiedad (NTU)	Meda	488	3,35	3,84	2,15	2,10	142	1,33	2,94	5,56	4,61	7,94	8,48	2,66	3,05	3,60	2,41	7,85	5,58	5,58	5,58	5,58	5,58	5,58	5,58	5,58	5,58	5,58	5,58	5,58	5,58	5,58	5,58	
	Mediana	5,50	3,40	5,00	2,00	1,90	1,30	1,30	2,55	5,00	3,50	3,50	3,50	2,50	3,20	2,70	2,70	5,60	5,90	5,90	5,90	5,90	5,90	5,90	5,90	5,90	5,90	5,90	5,90	5,90	5,90	5,90	5,90	
	Mínimo	3,20	2,60	1,80	1,20	1,50	0,69	1,00	1,40	2,60	3,10	3,50	3,50	1,50	2,20	1,40	1,40	3,10	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	
	Máximo	760	3,80	8,20	4,40	4,30	3,30	1,80	8,50	19,00	12,00	3,50	3,50	6,70	3,70	3,70	3,70	22,00	13,00	13,00	13,00	13,00	13,00	13,00	13,00	13,00	13,00	13,00	13,00	13,00	13,00	13,00	13,00	
	DE	175	0,47	4,53	1,21	1,04	1,04	0,40	2,74	6,78	3,77	0,00	0,00	2,11	0,62	1,15	1,15	8,04	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20		
pH	Meda	8,51	3,02	7,95	8,18	8,10	7,58	7,94	8,23	8,91	7,94	7,75	8,48	8,53	7,93	7,94	8,76	3,66	8,95	8,95	8,95	8,95	8,95	8,95	8,95	8,95	8,95	8,95	8,95	8,95	8,95	8,95	8,95	
	Mediana	9,00	8,40	7,95	7,84	8,27	7,40	7,80	7,90	9,10	7,60	8,30	8,30	8,79	7,80	8,55	8,55	9,18	9,10	9,10	9,10	9,10	9,10	9,10	9,10	9,10	9,10	9,10	9,10	9,10	9,10	9,10	9,10	
	Mínimo	6,60	7,03	7,90	7,70	7,00	7,02	7,58	7,77	8,10	6,85	7,65	7,65	6,98	7,01	8,00	8,00	6,80	7,03	7,03	7,03	7,03	7,03	7,03	7,03	7,03	7,03	7,03	7,03	7,03	7,03	7,03	7,03	
	Máximo	9,80	8,69	8,00	9,47	8,70	8,16	8,46	10,04	9,70	9,24	9,75	9,75	9,60	9,61	9,83	9,83	9,90	10,63	10,63	10,63	10,63	10,63	10,63	10,63	10,63	10,63	10,63	10,63	10,63	10,63	10,63	10,63	
	DE	1,20	0,70	0,07	0,73	0,65	0,47	0,46	0,87	0,65	1,00	0,84	0,84	0,98	0,97	0,94	0,94	1,33	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	
Conductividad (µS/cm)	Meda	80,3	66,9	115,5	103,6	80,8	66,0	87,0	106,0	77,4	72,5	66,0	92,6	83,3	72,6	64,0	85,9	80,0	68,9	68,9	68,9	68,9	68,9	68,9	68,9	68,9	68,9	68,9	68,9	68,9	68,9	68,9	68,9	
	Mediana	87,0	71,0	117,5	102,0	87,0	70,0	101,0	105,5	87,0	74,0	99,5	99,5	88,0	73,0	88,0	88,0	85,5	74,0	74,0	74,0	74,0	74,0	74,0	74,0	74,0	74,0	74,0	74,0	74,0	74,0	74,0		
	Mínimo	60,0	55,0	96,0	101,0	60,0	53,0	64,0	102,0	60,0	55,0	65,0	65,0	61,0	53,0	68,0	68,0	60,0	56,0	56,0	56,0	56,0	56,0	56,0	56,0	56,0	56,0	56,0	56,0	56,0	56,0	56,0	56,0	
	Máximo	92,0	80,0	139,0	108,0	93,0	80,0	102,0	110,6	98,0	90,0	108,0	108,0	114,0	90,0	106,0	106,0	110,0	81,0	81,0	81,0	81,0	81,0	81,0	81,0	81,0	81,0	81,0	81,0	81,0	81,0	81,0	81,0	
	DE	12,5	11,1	30,4	2,9	12,7	11,4	21,7	3,1	17,4	12,9	17,0	17,0	20,0	12,9	19,0	19,0	38,4	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5		

Tabla II.6.A.2. Cálculo de la media muestral, la mediana muestral, valores mínimos- máximos y desvíos estándares (DE) de los parámetros químicos registrados durante los monitoreos del periodo 2010-2011 agrupados por estación del año (verano, otoño, invierno y primavera)

ESTACIÓN DEL AÑO		SITIO DE MONITOREO																				
		Centro del Embalse (CE)				Pared del Dique (PD)				Desembocadura del río Los Espinillos (OLE)				Desembocadura del río San Pedro (OSP)				Desembocadura del río Los Reartes (DLR)				
N° de muestras		Verano	Otoño	Invierno	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	Primavera	
OD (mg/L)	Media	7,21	8,89	10,88	8,90	6,32	6,89	9,94	8,36	8,98	8,33	11,28	8,38	7,88	7,70	9,32	9,89	7,93	10,06	10,80	7,89	
	Mediana	9,00	8,40	10,89	9,03	7,00	7,20	10,11	8,06	9,16	8,33	8,62	8,62	8,10	8,14	9,70	9,70	8,45	9,80	10,80	7,85	
	Mínimo	2,18	7,60	10,61	7,13	2,72	4,52	9,60	6,88	7,76	6,85	6,28	6,28	6,27	6,08	9,26	9,26	4,98	8,90	10,61	6,56	
	Máximo	9,84	11,78	11,16	10,53	8,90	9,10	10,11	10,84	9,70	10,14	10,68	10,68	9,30	10,43	10,76	11,31	11,31	12,92	10,99	9,36	
	DE	2,88	1,70	0,39	1,25	2,13	1,98	0,29	1,53	0,76	1,35	1,59	1,59	1,26	1,78	0,77	2,23	2,23	1,60	0,27	1,15	
PRS (µg/L)	Media	1,17	1,11	1,14	10,5	12,4	13,2	10,6	11,4	14,7	11,1	n.d.	n.d.	13,0	11,5	10,0	11,0	12,9	14,0	10,0	11,3	
	Mediana	1,30	1,00	1,15	10,0	13,0	13,0	10,0	10,0	13,0	10,0	10,0	10,0	13,0	12,0	11,0	11,0	13,0	13,0	10,0	10,0	
	Mínimo	1,00	1,00	1,00	10,0	11,0	10,0	10,0	10,0	13,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	
	Máximo	1,30	1,30	1,30	13,0	14,0	24,0	12,0	17,0	21,0	13,0	17,0	17,0	17,0	17,0	13,0	12,0	12,0	16,0	20,0	19,0	
	DE	1,6	1,6	2,1	1,3	1,2	5,8	1,2	2,9	3,5	1,6	1,6	1,6	2,5	1,5	1,5	1,0	2,1	3,8	0,0	3,6	
PT (µg/L)	Media	3,74	3,13	2,97	18,2	28,1	2,16	17,2	22,8	4,33	41,1	n.d.	n.d.	31,0	26,6	26,0	19,3	59,3	56,8	31,7	32,4	
	Mediana	3,30	3,60	3,35	16,0	28,5	2,40	22,0	25,5	4,20	40,0	40,0	40,0	27,0	26,0	26,0	16,0	48,0	52,0	33,0	36,5	
	Mínimo	2,50	2,10	1,80	10,0	18,0	1,00	10,0	10,0	10,0	23,0	23,0	23,0	20,0	23,0	23,0	14,0	37,0	32,0	24,0	10,0	
	Máximo	8,00	4,20	4,90	40,0	36,0	37,0	23,0	34,0	77,0	75,0	75,0	75,0	55,0	36,0	36,0	32,0	103,0	152,0	42,0	70,0	
	DE	2,22	1,00	2,19	13,5	6,6	9,6	7,2	9,3	18,4	19,1	19,1	19,1	14,7	5,2	5,2	9,9	34,1	48,1	12,7	21,1	
N-N ₂ (mg/L)	Media	0,11	0,10	0,10	0,13	0,13	0,10	0,10	0,14	0,11	0,10	n.d.	n.d.	0,14	0,10	0,10	0,10	0,11	0,10	0,10	0,13	
	Mediana	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,15	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	
	Mínimo	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	
	Máximo	0,20	0,10	0,10	0,20	0,30	0,10	0,10	0,20	0,20	0,10	0,10	0,10	0,30	0,10	0,10	0,10	0,20	0,20	0,10	0,20	
	DE	0,04	0,00	0,00	0,05	0,08	0,00	0,00	0,05	0,04	0,00	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,05	
N-N ₂ (µg/L)	Media	6,0	6,0	6,0	6,9	6,0	6,5	6,0	6,4	6,0	6,0	n.d.	n.d.	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,4	
	Mediana	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	
	Mínimo	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	
	Máximo	6,0	6,0	6,0	12,0	6,0	9,0	6,0	9,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	9,0	
	DS	0,0	0,0	0,0	2,7	0,0	1,3	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	
N-NH ₄ ⁺ (µg/L)	Media	4,11	4,00	4,29	49,8	44,2	56,1	57,7	47,3	42,3	40,0	n.d.	n.d.	42,5	40,0	110,0	40,0	42,5	40,0	40,0	50,3	
	Mediana	4,00	4,00	4,30	40,0	40,0	62,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	43,0	
	Mínimo	4,00	4,00	4,00	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	
	Máximo	460	400	460	1200	540	900	1200	1100	460	460	460	460	540	460	460	460	460	540	460	460	1200
	DE	2,7	0,0	4,2	35,8	7,2	20,6	46,2	28,6	3,3	0,0	0,0	0,0	6,3	0,0	0,0	0,0	6,3	0,0	0,0	31,8	

Tabla II.6.A.2. Continúa -parámetros químicos registrados durante los monitoreos del periodo 2010-2011 agrupados por estación del año (verano, otoño, invierno y primavera)

		SITIO DE MONITOREO																															
		Centro del Embalse (CE)						Pared del Dique (PD)						Desembocadura del río Los Espinillos (DLE)						Desembocadura del río San Pedro (DSP)						Desembocadura del río Los Reartes (DLR)							
ESTACIÓN DEL AÑO	N° de muestras	Verano		Otoño		Invierno		Primavera		Verano		Otoño		Invierno		Primavera		Verano		Otoño		Invierno		Primavera		Verano		Otoño		Invierno		Primavera	
		6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6			
TOC (mg/L)	Media	4,40	3,63	3,05	3,34	3,52	3,17	2,99	3,32	4,22	3,85	nd.	nd.	4,19	3,43	3,10	3,20	5,29	4,51	3,33	3,51	3,20	3,20	3,10	3,30	7,00	5,60	3,70	4,70	1,04	0,78	0,49	0,63
	Mediana	3,70	3,80	3,05	3,40	3,45	3,10	3,10	3,30	4,10	3,70	nd.	nd.	4,00	3,60	3,10	3,20	5,00	4,60	3,35	3,30	3,20	3,10	3,30	7,00	5,60	3,70	4,70	1,04	0,78	0,49	0,63	
	Mínimo	3,40	3,30	3,00	2,90	3,20	2,70	2,70	2,80	3,80	3,10	nd.	nd.	3,30	3,00	3,10	3,10	4,40	4,00	3,35	3,30	3,20	3,10	3,30	7,00	5,60	3,70	4,70	1,04	0,78	0,49	0,63	
	Máximo	8,10	3,90	3,10	3,90	4,00	3,90	3,20	4,00	4,90	5,10	nd.	nd.	6,10	3,70	3,70	3,30	7,00	7,00	5,60	3,70	4,70	3,30	3,30	7,00	5,60	3,70	4,70	1,04	0,78	0,49	0,63	
	DE	1,97	0,27	0,07	0,36	0,36	0,47	0,26	0,46	0,41	0,73	nd.	nd.	1,06	0,32	0,10	0,10	1,04	0,78	0,49	0,63	0,10	0,10	0,10	0,10	1,04	0,78	0,49	0,63	0,10	0,10	0,10	0,10
Alcalinidad (mg/L)	Media	41,5	37,6	46,5	43,6	41,5	36,9	40,6	44,3	38,0	35,3	nd.	nd.	42,9	36,5	43,0	44,0	38,8	36,5	41,8	48,0	44,0	44,0	44,0	38,8	36,5	41,8	48,0	37,0	36,5	42,0	0,0	
	Mediana	41,0	37,0	46,0	44,0	40,5	38,0	42,0	44,0	38,5	35,0	nd.	nd.	44,0	36,5	44,0	44,0	37,0	36,5	42,0	48,0	44,0	44,0	44,0	37,0	36,5	42,0	48,0	37,0	36,5	42,0	0,0	
	Mínimo	38,0	36,0	42,0	42,0	38,0	34,0	38,0	43,0	35,0	34,0	nd.	nd.	39,0	35,0	34,0	34,0	36,0	35,0	38,0	48,0	44,0	44,0	44,0	36,0	35,0	38,0	48,0	36,0	35,0	38,0	0,0	
	Máximo	47,0	40,0	55,0	45,0	47,0	39,0	42,0	46,0	40,0	37,0	nd.	nd.	46,0	38,0	37,0	37,0	44,0	44,0	46,0	55,0	44,0	44,0	44,0	44,0	44,0	46,0	55,0	44,0	44,0	44,0	0,0	
	DE	3,6	1,5	9,9	1,1	3,7	2,3	2,3	1,0	2,2	1,5	nd.	nd.	3,6	2,1	2,2	1,5	4,4	2,1	5,7	0,0	2,8	2,8	2,8	2,8	4,4	2,1	5,7	0,0	2,8	2,8	2,8	0,0
Dureza (mg/L)	Media	28,6	26,8	31,3	31,0	28,4	26,2	29,0	31,9	27,0	27,0	nd.	nd.	29,3	27,5	29,0	28,0	26,9	26,5	29,0	31,0	28,0	28,0	28,0	26,9	26,5	29,0	31,0	26,0	26,5	29,0	0,0	
	Mediana	29,0	27,0	31,5	31,0	28,0	27,0	30,0	31,0	27,0	26,0	nd.	nd.	29,0	27,5	29,0	28,0	26,0	26,5	29,0	31,0	28,0	28,0	26,9	26,5	29,0	31,0	26,0	26,5	29,0	0,0		
	Mínimo	26,0	26,0	28,0	29,0	26,0	24,0	27,0	29,0	26,0	26,0	nd.	nd.	26,0	27,0	26,0	26,0	25,0	26,0	26,0	28,0	28,0	28,0	26,0	26,0	26,0	28,0	26,0	26,0	26,0	26,0	0,0	
	Máximo	31,0	28,0	35,0	33,0	32,0	27,0	30,0	38,0	28,0	29,0	nd.	nd.	31,0	28,0	28,0	29,0	30,0	27,0	26,0	28,0	31,0	28,0	28,0	30,0	27,0	26,0	28,0	26,0	26,0	26,0	0,0	
	DE	1,8	0,8	4,9	1,6	2,2	1,3	1,7	3,3	0,8	1,7	nd.	nd.	1,5	0,7	0,8	1,7	2,6	0,7	1,4	0,0	2,8	2,8	2,8	2,6	0,7	1,4	0,0	2,8	2,8	2,8	0,0	
Clorofila (µg/L)	Media	18,0	29,4	6,7	5,8	7,0	2,4	1,8	6,0	11,9	33,4	nd.	nd.	10,8	14,3	3,0	7,2	48,5	66,3	14,1	10,3	7,2	7,2	7,2	48,5	66,3	14,1	10,3	48,5	66,3	14,1	10,3	
	Mediana	19,0	40,0	7,0	5,0	6,0	2,0	2,0	6,0	21,0	24,0	nd.	nd.	8,0	11,0	3,0	9,0	29,0	42,0	27,0	10,0	9,0	9,0	9,0	29,0	42,0	27,0	10,0	29,0	42,0	27,0	10,0	
	Mínimo	4,0	12,0	5,0	3,0	4,0	1,0	1,0	2,0	3,0	11,0	nd.	nd.	3,0	8,0	3,0	3,0	21,0	19,0	4,0	4,0	3,0	3,0	3,0	21,0	19,0	4,0	4,0	21,0	19,0	4,0	4,0	
	Máximo	87,0	51,0	9,0	18,0	23,0	10,0	3,0	20,0	35,0	44,0	nd.	nd.	57,0	50,0	14,0	14,0	125,0	38,0	50,0	40,0	14,0	14,0	14,0	125,0	38,0	50,0	40,0	125,0	38,0	50,0	40,0	
	DE	33,8	17,3	2,8	6,1	7,2	3,7	1,0	6,7	13,3	58,2	nd.	nd.	22,2	17,8	5,5	5,5	53,1	150,5	32,5	13,3	5,5	5,5	5,5	53,1	150,5	32,5	13,3	53,1	150,5	32,5	13,3	
DQO (mg/L)	Media	22,6	14,0	15,7	15,7	13,9	15,6	23,0	12,9	14,7	11,6	24,4	13,4	16,8	12,1	14,5	14,5	14,5	18,8	11,3	11,6	11,6	14,5	14,5	18,8	11,3	11,6	11,3	11,6	11,3	11,6		
	Mediana	23,1	15,0	15,7	15,7	15,0	16,0	24,0	10,9	13,5	13,4	24,4	13,4	14,7	13,1	14,5	14,5	14,5	18,8	11,3	11,6	11,6	14,5	14,5	18,8	11,3	11,6	11,3	11,6	11,3	11,6		
	Mínimo	14,3	6,8	15,0	15,0	8,0	10,3	20,2	7,0	11,0	6,3	5,3	5,3	10,2	8,1	8,8	8,8	8,8	13,4	8,5	8,5	8,5	8,8	8,8	13,4	8,5	8,5	8,5	8,8	8,5	8,5		
	Máximo	35,0	26,2	16,4	16,4	29,9	19,0	25,0	30,0	28,0	19,0	32,0	32,0	35,5	18,3	19,0	19,0	26,0	30,8	15,0	18,2	18,2	19,0	19,0	26,0	30,8	15,0	18,2	26,0	30,8	15,0	18,2	
	DE	8,9	7,4	1,0	1,0	8,6	3,5	2,5	8,8	7,0	4,9	10,0	10,0	11,6	3,9	5,7	5,7	8,4	7,8	4,6	4,6	4,6	5,7	5,7	8,4	7,8	4,6	4,6	8,4	7,8	4,6		

Tabla II.6.A.3. Cálculo de la media muestral, la mediana muestral, valores mínimos- máximos y desvíos estándares (DE) de los parámetros biológicos registrados durante los monitoreos del periodo 2008-2011 agrupados por estación del año (verano, otoño, invierno y primavera)

		SITO DE MONITOREO																							
		Centro del Embalse (CE)			Pared del Dique (PD)			Desembocadura del río Los Espinillos (DE)			Desembocadura del río San Pedro (DSP)			Desembocadura del río Los Reartes (DLR)											
ESTACIÓN DEL AÑO	N° de muestras	Verano		Otoño		Invierno		Primavera		Verano		Otoño		Invierno		Primavera		Verano		Otoño		Invierno		Primavera	
		6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	
Bacterias heterótrofas (UFC/mL)	Media	8,9E+02	6,2E+02	1,1E+02	2,6E+03	5,9E+02	5,4E+02	1,4E+02	1,5E+03	9,5E+02	9,7E+02	1,2E+02	1,7E+03	7,1E+02	9,1E+02	1,1E+02	2,1E+03	1,5E+03	1,5E+03	1,5E+03	1,7E+03	1,4E+02	1,4E+02	1,4E+02	2,0E+03
	Mediana	1,1E+03	4,3E+02	1,4E+02	1,3E+03	3,9E+02	5,7E+02	1,1E+02	8,8E+02	7,1E+02	1,1E+03	1,2E+02	1,5E+03	8,7E+02	6,7E+02	1,3E+02	2,1E+03	1,6E+03	1,6E+03	1,6E+03	1,8E+03	1,5E+02	1,5E+02	1,5E+02	2,0E+03
	Mínimo	2,8E+02	1,9E+02	6,0E+01	5,0E+02	2,7E+02	1,6E+02	8,0E+01	6,1E+02	5,0E+02	1,9E+02	1,2E+02	3,5E+02	3,2E+02	3,2E+02	5,0E+01	1,8E+03	4,1E+02	4,1E+02	4,1E+02	9,2E+02	1,2E+02	1,2E+02	1,2E+02	5,1E+02
	Máximo	2,6E+03	3,5E+03	2,1E+02	2,6E+04	3,2E+03	1,3E+03	3,2E+02	4,0E+04	3,2E+03	4,4E+03	1,2E+02	1,6E+04	1,3E+03	3,8E+03	2,1E+02	2,1E+03	9,6E+03	9,6E+03	9,6E+03	3,1E+03	1,7E+02	1,7E+02	1,7E+02	1,6E+04
	DE	1,1E+03	1,4E+03	1,1E+02	1,1E+04	1,2E+03	4,4E+02	1,3E+02	1,6E+04	1,3E+03	1,9E+03	5,8E+03	5,8E+03	5,0E+02	1,5E+03	1,2E+02	1,9E+02	4,4E+03	4,4E+03	4,4E+03	9,2E+02	3,5E+01	3,5E+01	3,5E+01	5,0E+03
Coliformes termotolerantes (NMP/100 mL)	Media	16,8	4,2	3,6	22,6	10,5	4,9	1,5	11,7	23,0	8,8	<3	32,9	38,4	3,9	3,6	11,2	21,2	21,2	24,4	24,4	1,9	1,9	1,9	37,1
	Mediana	23,0	3,6	3,6	75,0	9,0	7,3	1,0	13,0	21,5	11,2	<3	23,0	33,0	3,6	3,6	4,2	18,0	18,0	27,0	27,0	2,3	2,3	2,3	49,0
	Mínimo	9,0	3,0	3,0	1,0	3,6	1,0	1,0	1,0	9,2	3,6	3,6	3,6	9,2	1,0	1,0	3,6	15,0	15,0	10,0	10,0	1,0	1,0	1,0	3,6
	Máximo	23,0	9,2	9,2	93,0	23,0	43,0	3,6	75,0	93,0	15,0	4600	2018	240,0	23,0	23,0	93,0	43,0	43,0	75,0	75,0	3,6	3,6	3,6	100,0
	DE	8,1	2,6	2,6	45,6	9,2	17,6	1,5	26,8	38,3	5,7	2018	108,4	108,4	9,4	51,4	51,4	13,3	13,3	30,9	30,9	1,8	1,8	1,8	387,9
<i>Escherichia coli</i> (NMP/100 mL)	Media	10,7	3,6	3,6	12,0	3,6	5,8	3,6	9,8	7,2	6,2	<3	15,3	16,2	3,6	<3	4,8	9,8	9,8	12,5	12,5	<3	<3	<3	15,8
	Mediana	15,0	3,6	3,6	39,0	3,6	3,6	3,6	7,3	6,3	5,5	24,3	16,0	16,0	3,6	3,6	3,6	11,2	11,2	7,3	7,3	7,3	7,3	7,3	20,0
	Mínimo	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	2,0	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6
	Máximo	23,0	23,0	15,0	93,0	23,0	15,0	15,0	75,0	23,0	15,0	93,0	93,0	93,0	23,0	23,0	15,0	23,0	23,0	75,0	75,0	75,0	75,0	75,0	150,0
	DE	9,7	47,9	47,9	47,9	28,0	28,0	28,0	60,7	40,2	16,7	733,5	42,5	41,4	9,2	7,1	7,1	8,6	8,6	31,8	31,8	31,8	31,8	31,8	54,8
Estreptococos fecales (NMP/100 mL)	Media	9,1	6,8	7,3	79,3	11,5	24,3	24,2	22,8	20,5	10,1	3,6	46,1	12,1	10,1	3,6	28,3	41,6	41,6	12,8	12,8	26,0	26,0	26,0	56,4
	Mediana	9,2	3,6	9,3	43,0	15,0	23,0	3,6	9,1	16,1	15,0	3,6	51,0	12,1	3,6	3,6	75,0	37,5	37,5	23,0	23,0	42,0	42,0	42,0	68,0
	Mínimo	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	9,0	3,6	3,6	9,0	2,0	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	23,0	23,0	1,0	1,0	9,0	9,0	9,0	3,6
	Máximo	23,0	23,0	15,0	15000	23,0	75,0	100,0	150,0	93,0	43,0	150,0	150,0	43,0	210,0	210,0	93,0	93,0	93,0	43,0	43,0	75,0	75,0	75,0	150,0
	DE	10,0	8,8	8,1	811,6	7,1	26,6	63,0	60,7	40,2	16,7	733,5	42,5	41,4	9,2	7,1	7,1	8,6	8,6	31,8	31,8	31,8	31,8	31,8	54,8
Enterococos (NMP/100 mL)	Media	9,1	4,9	<3	6,1	3,6	7,7	<3	3,6	10,6	4,9	<3	15,2	18,0	4,2	<3	12,4	9,6	9,6	6,2	6,2	<3	<3	<3	34,8
	Mediana	13,3	3,6	3,6	5,5	13,3	3,6	3,6	3,6	13,3	3,6	6,3	6,3	15,0	3,6	3,6	23,3	13,3	13,3	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	15,0
	Mínimo	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	9,0	1,0	1,0	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	1,0	1,0	1,0	3,6
	Máximo	23,0	9,2	9,2	15,0	43,0	75,0	75,0	150,0	43,0	9,2	4600	227,3	43,0	21,0	21,0	43,0	29,0	29,0	75,0	75,0	23,0	23,0	23,0	100,0
	DE	13,7	3,2	3,2	5,4	18,8	35,7	35,7	60,7	18,8	3,2	227,3	42,5	41,4	10,9	7,9	7,9	13,2	13,2	9,3	9,3	9,3	9,3	9,3	47,3,5

Tabla II.6.A.4. Correlación de Spearman (r_s) de los parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos. Se presentan las correlaciones significativas con un nivel de significancia $P < 0,05$

VARIABLES CORRELACIONADAS	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN (r_s)	P-VALOR significancia ($P < 0,05$)
Secchi vs. Turbiedad	-0,789	<0,001
Secchi vs. PT	-0,651	<0,001
Secchi vs. TOC	-0,584	<0,001
Secchi vs. Clorofila	-0,630	<0,001
Secchi vs. <i>E.coli</i>	-0,248	0,043
Temp.del Agua vs. OD	-0,327	0,007
Temp.del Agua vs. pH	0,333	0,006
Temp.del Agua vs. PRS	0,448	<0,001
Temp.del Agua vs. TOC	0,491	<0,001
Temp.del Agua vs. Coliformes termotolerantes	0,392	0,001
OD vs. PRS	-0,265	0,030
OD vs. N-NO ₃	-0,316	0,009
OD vs. Alcalinidad	0,256	0,037
pH vs. PT	0,340	0,005
pH vs. Clorofila	0,400	0,001
Conductividad - vs. N-NO ₃	0,399	0,001
Conductividad - vs. Alcalinidad	0,291	0,017
Conductividad - vs. Dureza	0,461	<0,001
Conductividad - vs. Heterótrofos	0,298	0,014
Turbiedad vs. PT	0,619	<0,001
Turbiedad vs. N-NH ₄	-0,285	0,019
Turbiedad vs. TOC	0,534	<0,001
Turbiedad vs. Clorofila	0,627	<0,001
Turbiedad vs. Coliformes termotolerantes	0,251	0,040
PRS vs. N-NH ₄	0,292	0,016
PRS vs. TOC	0,406	0,001
PRS vs. Alcalinidad	-0,240	0,050
PT vs. TOC	0,521	<0,001
PT vs. Dureza	-0,353	0,003
PT vs. Clorofila	0,676	<0,001
N-NO ₃ vs. N-NO ₂	0,482	<0,001
N-NO ₃ vs. N-NH ₄	0,312	0,010
N-NO ₃ vs. Dureza	0,300	0,014
N-NO ₃ vs. Clorofila	-0,354	0,003
N-NH ₄ vs. Clorofila	-0,451	<0,001
TOC vs. Alcalinidad	-0,274	0,025
TOC vs. Dureza	-0,295	0,015
TOC vs. Clorofila	0,604	<0,001
TOC vs. Coliformes termotolerantes	0,255	0,037
Alcalinidad vs. Dureza	0,745	<0,001
Dureza vs. Clorofila	-0,306	0,012
Clorofila vs. <i>E.coli</i>	0,268	0,029
Heterótrofos vs. Coliformes termotolerantes	0,431	<0,001
Heterótrofos vs. <i>E.coli</i>	0,331	0,006
Heterótrofos vs. Estreptococos fecales	0,267	0,029
Heterótrofos vs. Enterococos	0,299	0,014
Coliformes termotolerantes vs. <i>E.coli</i>	0,759	<0,001
Coliformes termotolerantes vs. Estreptococos fecales	0,276	0,024
Coliformes termotolerantes vs. Enterococos	0,323	0,008
<i>E.coli</i> vs. Enterococos	0,339	0,005
Estreptococos fecales vs. Enterococos	0,626	<0,001

ANEXO III. FOTOGRAFÍAS DE LAS COLONIAS CRECIDAS EN PLACA DE PETRI Y CITOGRAMAS

III. A Comparación de las características morfológicas observables de las colonias del control y de las muestras tratadas con atrazina y 2,4-D.

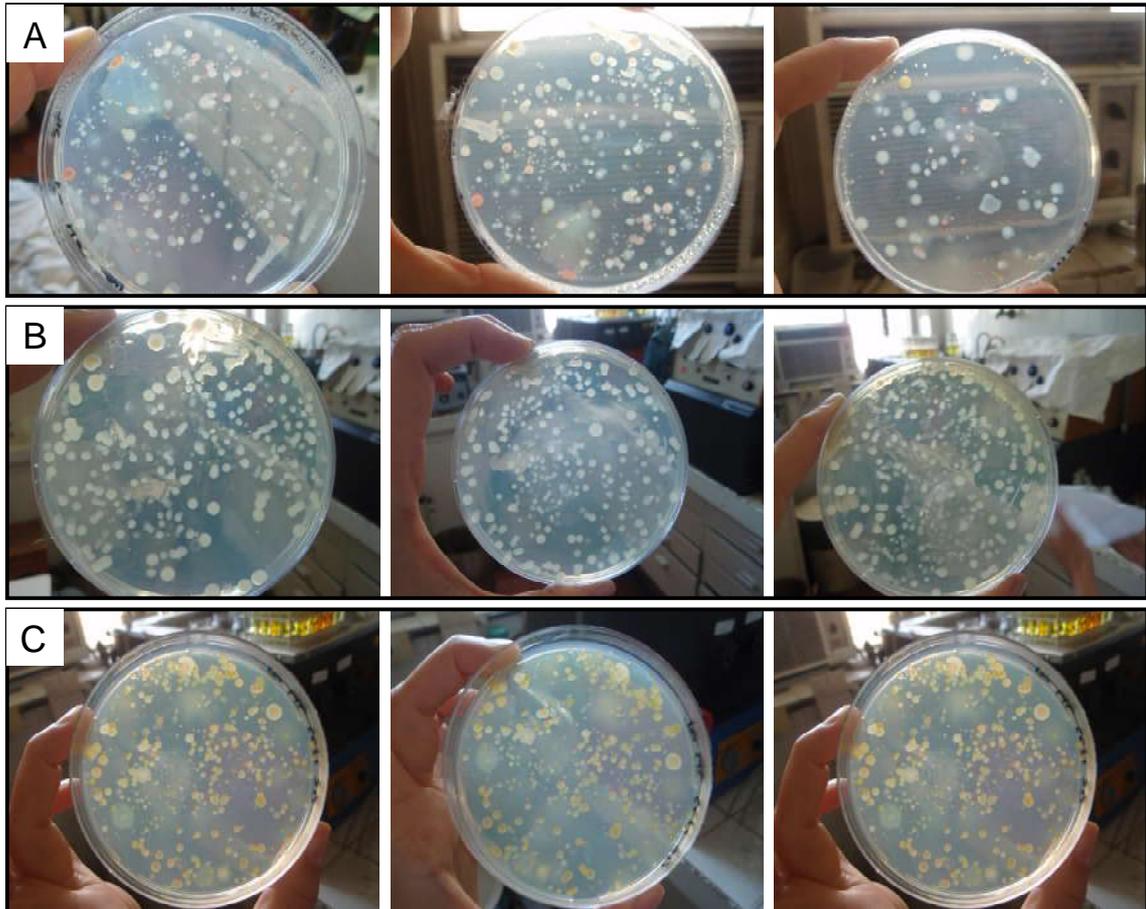


Figura III.A1. Fotografías de las colonias crecidas en placa de Petri con agar R2A. Se presentan tres fotografías correspondientes a una muestra extraída en la estación de verano de 2010 al finalizar el ensayo de tolerancia. A) control a T120, B) muestras expuestas a 2 mg/L de atrazina (A3) y C) muestras expuestas a 200 mg/L de 2,4-D (D3). Se presentan crecimiento de muestras sin diluir y con una dilución 1/10.

III. B Citogramas correspondientes a los ensayos de tolerancia estacionales

Se complementan los citogramas presentados en la Figura 4-5

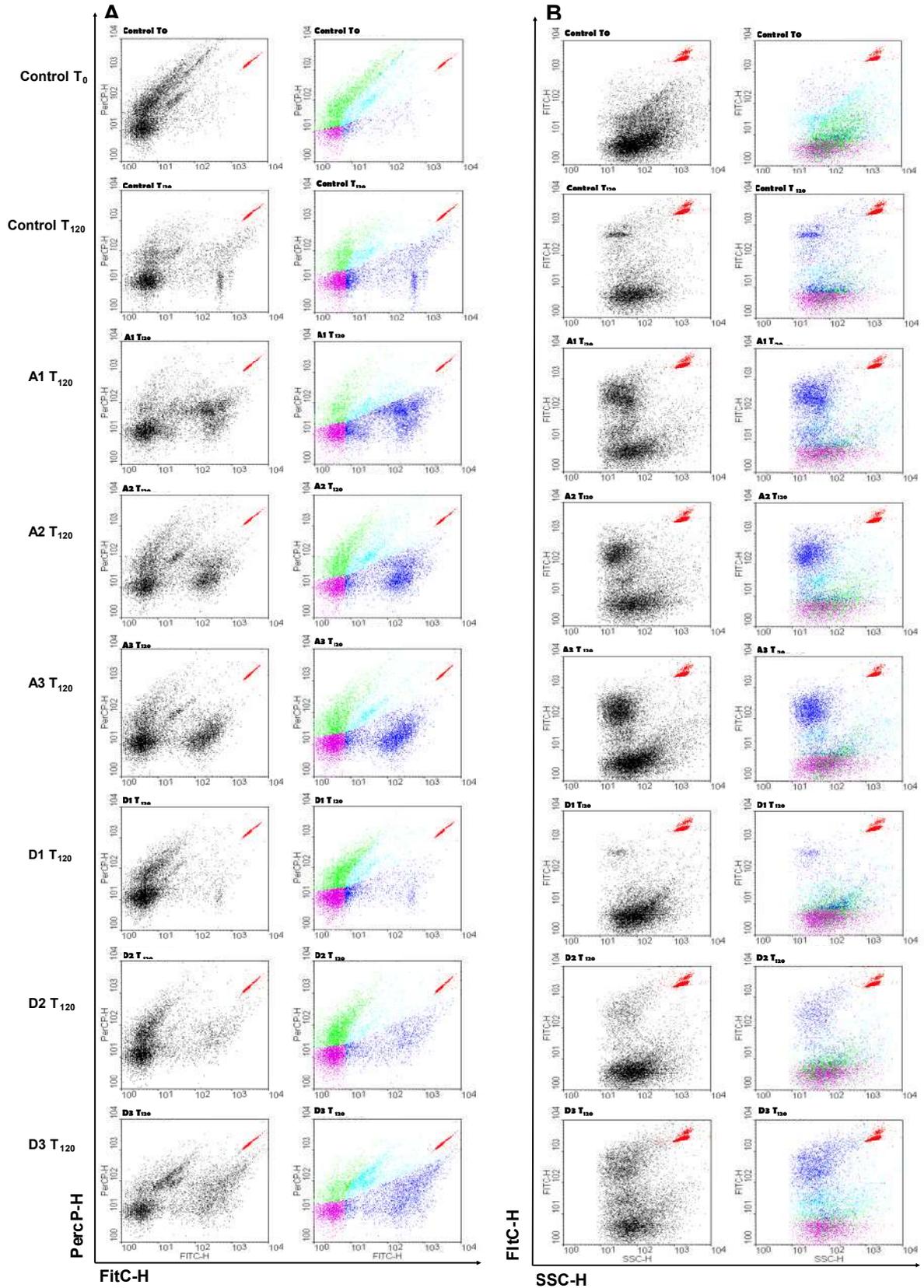


Figura III.B.1. Citogramas correspondientes a los ensayos de otoño. Se grafican los parámetros PercP-H vs. FitC-H (Grupos A) y FitC-H vs. SSC-H (Grupos B). Por cada muestra se representa el citograma solo y los agrupamientos por estado metabólico: bacterias muertas (verde), injuriadas (celeste), vivas-activas (azul) y vivas-no activas (rosa).

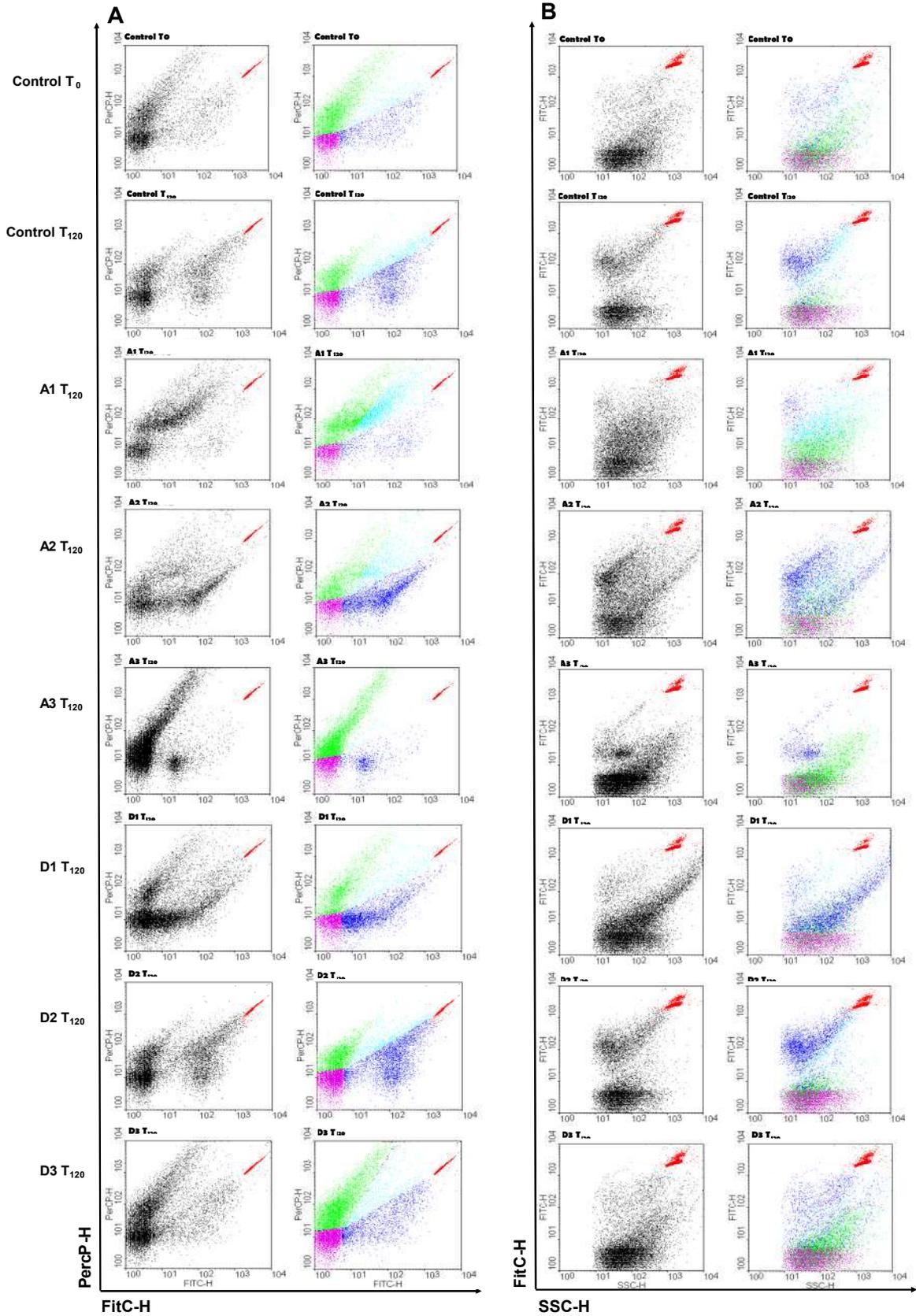


Figura III.B.2. Citogramas correspondientes a los ensayos de invierno. Se grafican los parámetros PercP-H vs. FitC-H (Grupos A) y FitC-H vs. SSC-H (Grupos B). Por cada muestra se representa el citograma solo y los agrupamientos por estado metabólico: bacterias muertas (verde), injuriadas (celeste), vivas-activas (azul) y vivas-no activas (rosa).

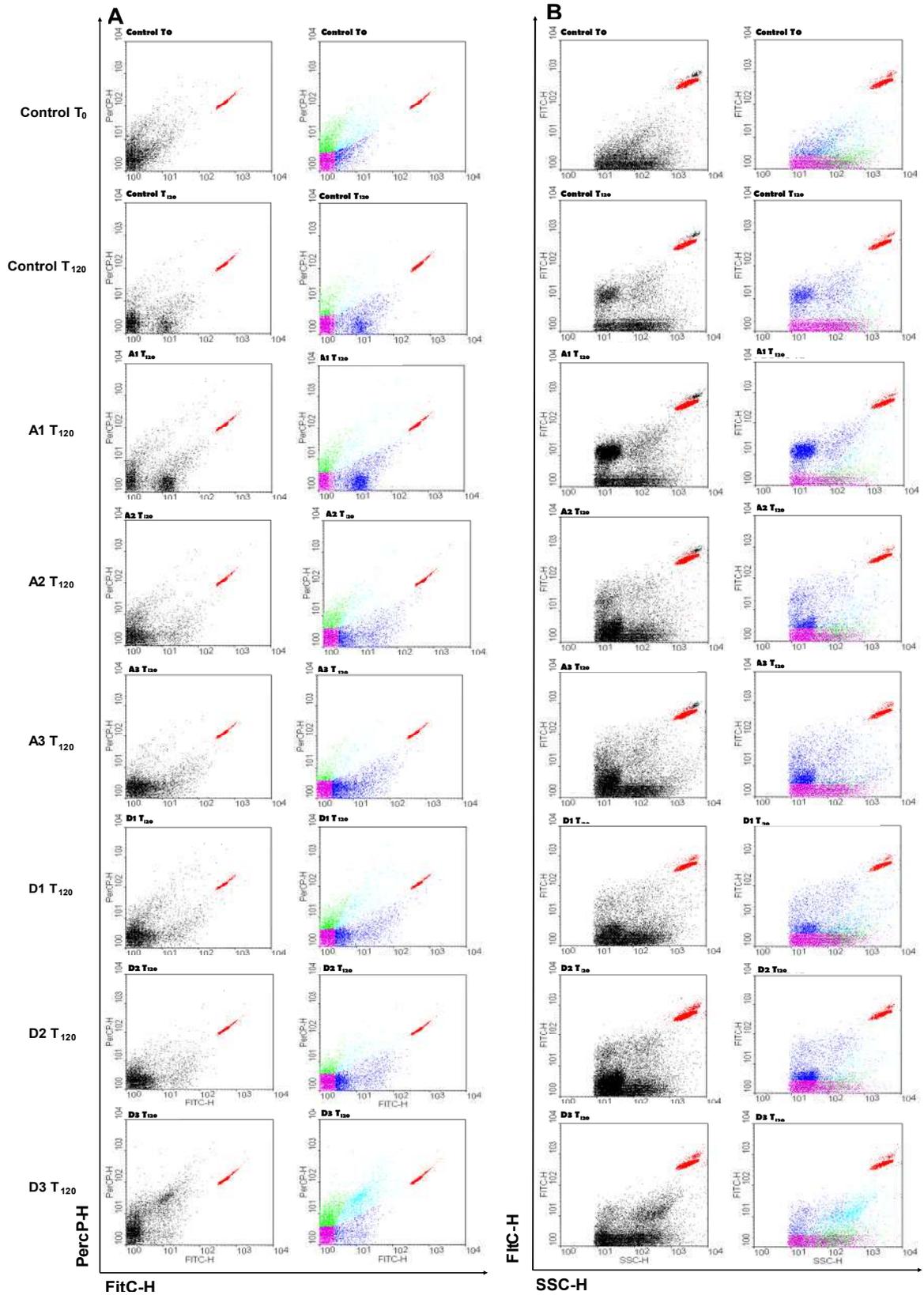


Figura III.B.3. Citogramas correspondientes a los ensayos de primavera. Se grafican los parámetros PercP-H vs. FitC-H (Grupos A) y FitC-H vs. SSC-H (Grupos B). Por cada muestra se representa el citograma solo y los agrupamientos por estado metabólico: bacterias muertas (verde), injuriadas (celeste), vivas-activas (azul) y vivas-no activas (rosa).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abigail E.A., Das N.** (2012). Microbial Degradation of Atrazine, Commonly Used Herbicide. *International Journal of Advanced Biological Research* 2(1): 16-23
- Agnelli A., Ascher J., Corti G., Ceccherini M.T., Nannipieri P., Pietramellara G.** (2004). Distribution of Microbial Communities in a Forest Soil Profile Investigated by Microbial Biomass, Soil Respiration and DGGE of Total and Extracellular DNA. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 859-868
- Alakomi H.L., Saarela M., Helander I.M.** (2003) . Effect of EDTA on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Involves a Component not Assignable to Lipopolysaccharide Release. *Microbiology* 149(8): 2015-2021
- Allison S.D., Martiny J.B.H.** (2008). Resistance, Resilience, and Redundancy in Microbial Communities. *PNAS* 105(1)
- Ambrosino S.** (2000). Caracterización Geológica y Geomorfológica de la Cuenca del Embalse Los Molinos, Córdoba. Tesina de grado. Córdoba, Argentina: Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba.
- Andreatta S., Wallinger M.M., Posch T., Psenner R.** (2001). Detection of Subgroups from Flow Cytometry Measurements of Heterotrophic Bacterioplankton by Image Analysis. *Cytometry* 44: 218-225
- APHA** - Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2005). 21th American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Washington, DC.
- Araya R., Tani K., Takagi T., Yamaguchi N. Nasu M.** (2003). Bacterial Activity and Community Composition in Stream Water and Biofilm from an Urban River Determined by Fluorescent *in situ* Hybridization and DGGE Analysis. *FEMS Microbiology Ecology* 43: 111-119
- Arbeli Z., Fuentes C.L.** (2007). Accelerated Biodegradation of Pesticides: An Overview of the Phenomenon, its Basis and Possible Solutions; and a Discussion on the Tropical Dimension. *Crop Protection* 26: 1733-1746
- Argese E., Bettiol C., Marchetto D., Vettori S., Zambon A., Miana P., Ghetti PF.** (2005) Study on the Toxicity of Phenolic and Phenoxy Herbicides Using the Submitochondrial Particle Assay. *Toxicology in Vitro* 19: 1035-1043
- Atlas R., Bartha R.** (2002) *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. Addison Wesley 4^o Ed.
- Azam F., Fenchel T., Field J.G., Gray J.S., Meyer-Reil L.A., Thingstad F.** (1983). The Ecological Role of Water Column Microbes in the Sea. *Marine Ecology Progress Series* 10: 257-263
- Baho D.L.** (2010). Resistance and Resilience of Microbial Communities-temporal and Spatial Insurance against Perturbation. Master Thesis in Science. Biology Education Centre and Limnology, Uppsala University. Suecia
- Baron J.S., LeRoy Poff N., Angermeier P.L., Dahm C.N., Gleick P.H., Hairston N.G., Robert R., Jackson B., Johnston C.A., Richter B.D., Steinman A.D.** (2003). Ecosistemas de Agua Dulce Sustentables.

Tópicos en Ecología. Disponible en: http://www.esa.org/science_resources/issues/FileSpanish/issue10.pdf

- Barra R., Vighi M., Di Guardo A.** (1995) Prediction of Surface Water Input of Chloridazon and Chlorpyrifos from an Agricultural Watershed in Chile. *Chemosphere* 30(3): 485-500
- Barra R., Maffioli G., Notarianni V., Mazzuchelli P., Vighi M.** (1999). Patrones de Contaminación por Herbicidas en Aguas Superficiales en una Cuenca Agrícola. *Ecotoxicology and Environmental Restoration* 2: 75-83
- Barra R., Vighi M., Maffioli G., Di Guardo A., Ferrario P.** (2000). Coupling Soilfug Model and GIS for Predicting Pesticide Pollution of Surface Water at Watershed Level. *Environmental Science and Technology* 34: 4425-4433
- Barrell R.A.E., Hunter P.R., Nichols G.** (2000). Microbiological Standards for Water and their Relationship to Health Risk. *Communicable Disease and Public Health* 3(1): 8-13
- Battaglin A., Hay L.E.** (1996). Effects of Sampling Strategies on Estimates of Annual Mean Herbicide Concentrations in Midwestern Rivers. *Environmental Science and Technology* 30(3): 889-896
- Bazán R., Oroná C., Larrosa N., Olmo S., Cossavella A., Corral M., Rodríguez A., Wunderlin D.** (2004). Monitoreo Optimizado de la Calidad del Agua del Embalse Los Molinos, Córdoba. Asociación Argentina de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente. Desafíos Ambientales y del Saneamiento en el Siglo XXI. Buenos Aires, AIDIS Argentina, pp.1-4, Congreso Argentino de Saneamiento y Medio Ambiente, 14, Buenos Aires, Argentina.
- Bazán R., Corral M., Pagot M., Rodríguez A., Oroná C., Rodríguez M.I., Larrosa N., Cossavella A.** (2005). Teledetección y Modelado Numérico para el Análisis de la Calidad de Agua del Embalse Los Molinos (Córdoba, Argentina). *Ingeniería Hidráulica de México* 20: 121-135
- Benki R., Topp E., Dick W., Germon P.** (1993) Metabolism of the Herbicide Atrazine by *Rhodococcus* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 1955-1959
- Benoit P., Barriuso E.** (1999). Degradation of 2,4-D, 2,4-Dichlorophenol, and 4-Chlorophenol in Soil after Sorption on Humified and Nonhumified Organic Matter. *Journal of Environmental Quality* 28: 1127-1135
- Bérard A., Benninghoff C.** (2001). Pollution-Induced Community Tolerance (PICT) and Seasonal Variations in the Sensitivity of Phytoplankton to Atrazine in Nanocosms. *Chemosphere* 45: 427-437
- Berdjeb L., Ghiglione J-F., Jacquet S.** (2011). Bottom-Up versus Top-Down Control of Hypo- and Epilimnion Free-Living Bacterial Community Structures in Two Neighboring Freshwater Lakes. *Applied and Environmental Microbiology* 77(11): 3591-3599
- Bergel Santibañez N.D.** (2004). Estimación del Destino Ambiental de los Pesticidas Empleados en Sistemas Agroforestales de la Cuenca del Estero Peupeu de la Comuna de Lautaro, IX Región. Universidad Católica de Temuco. Facultad de Ciencias- Universidad Católica de Temuco. Tesis Licenciatura pp.156
- Berney M., Hammes F., Bosshard F., Weilenmann H-U., Egli T.** (2007). Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using theLIVE/DEAD BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* 73(10): 3283-3290

- Bianchi A., Giuliano L. (1996).** Enumeration of Viable Bacteria in the Marine Pelagic Environment. *Applied and Environmental Microbiology* 62(1):174-177
- Blanck, H., Wängberg S.A., Molander S. (1988).** Pollution-Induced Community Tolerance. A new ecotoxicological tool. In: Cairns JJ and Pratt JR (Eds), *Functional Testing of Aquatic Biota for Estimating Hazards of Chemicals*. ASTM STP 988: 219-230. American Society for Testing and Materials. Philadelphia, PA, USA
- Boivin, M-E., Breure A.M., Posthuma, L., Rutgers M. (2002).** Determination of Field Effects of Contaminants- Significance of Pollution-Induced Community Tolerance. *Human Environmental Risk Assessment* 8: 1035-1055
- Boivin M-E., Massieux B., Breure A.M., van den Ende F.P., Greve G.D., Rutgers M., Admiraal W. (2005).** Effects of Copper and Temperature on Aquatic Bacterial Communities. *Aquatic Toxicology* 71: 345-356
- Boudou A., Ribeyre F. (1997).** Aquatic Ecotoxicology: From the Ecosystem to the Cellular and Molecular Levels. *Environmental Health Perspectives* 105 (1)
- Boulos L., Prévost M., Barbeau B., Coallier J., Desjardins R. (1999).** LIVE/DEAD BacLight E: Application of a New Rapid Staining Method for Direct Enumeration of Viable and Total Bacteria in Drinking Water. *Journal of Microbiological Methods* 37: 77-86
- Bouvier T., del Giorgio P.A, Gasol J.M. (2007).** A Comparative Study of the Cytometric Characteristics of High and Low Nucleic-Acid Bacterioplankton Cells From Different Aquatic Ecosystems. *Environmental Microbiology* 9 (8): 2050-2066
- Brock T. (1998).** Assessing Chemical Stress in Aquatic Ecosystems: Remarks on the Need of an Integrative Approach. *Aquatic Ecology* 32: 107-111
- Brock T.; Gertie H.P., Arts L., Maltby L., Van den Brink P.(2006).** Aquatic Risks of Pesticides, Ecological Protection Goals, and Common Aims in European Union Legislation. *Integrated Environmental Assessment and Management* 2, (4): 20-46
- Bukowska B. (2006).** Toxicity of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Molecular Mechanisms. *Polish Journal of Environmental Studies* 15(3): 365-374
- Bukowska B., Hutnik K. (2006).** 2,4-D and MCPA and their Derivatives, Effect on the Activity of Membrane Erythrocytes Acetylcholinesterase (*in vitro*). *Pesticide. Biochemistry and Physiology* 85: 174-180
- Bunthof C.J. (2002)** Flow Cytometry, Fluorescent Probes and Flashing Bacteria. PhD. Thesis Wageningen University, Wageningen, Holanda. pp.160
- Burtscher M.M., Zibuschka F., Mach R.L., Lindner G., Farnleitner A.H. (2009).** Heterotrophic Plate Count Vs. *in Situ* Bacterial 16S rRNA Gene Amplicon Profiles from Drinking Water Reveal Completely Different Communities with Distinct Spatial and Temporal Allocations in a Distribution Net. *Water Research Commission. South African* 35(4): 495-504
- Bustamante A.; Lopez F., Bonetto C., Granero M. (2002).** Limnology of Mountains Rivers and Transport of Phosphorus and Nitrogen to an Enriched Reservoir (Córdoba, Argentina). *Verhandlungen Internationalem Vereinigung für Limnologie* 28: 1779-1782
- Bustamante A., Ruiz M., López F., Bonetto C. (2007).** Características Regionales y Transporte de Nutrientes y Sedimentos en una Cuenca Semiárida. XXIº Congreso Nacional del Agua, Tucumán, Argentina.

- Calamari D., Zhang L.** (2002). Environmental Risk Assessment of Pesticides on Aquatic Life in Xiamen, China. *Toxicology Letters* 128: 45-53
- Calcagno A., Mendiburo N., Gaviño Novillo M.** (2000). Informe sobre la Gestión del Agua en la República Argentina. CEPAL. Naciones Unidas. Disponible en: <http://www.eclac.cl/samtac/noticias/documentosdetrabajo/6/23306/InAr00200.pdf>.
- Campbell C.D., Chapman S.J., Cameron C.M., Davidson M.S., Potts J.M.** (2003). Rapid Microtiter Plate Method to Measure Carbon Dioxide Evolved from Carbon Substrate Amendments so as to Determine the Physiological Profiles of Soil Microbial Communities by Using Whole Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3593-3599
- Cantú M.P., Becker A., Bedano J.C., Schiavo H.F.** (2007). Evaluación del Calidad Suelos Mediante el Uso de Indicadores e Índices. *Ciencia Del Suelo* 25(2): 173-178
- Carpenter S., Caraco N.F., Correll D.L., Howarth R.W.; Sharpley A.N., Smith V.H.** (1998). Contaminación No Puntual De Aguas Superficiales con Fósforo y Nitrógeno. *Tópicos en Ecología* 3
- CASAFE - Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes** (2007). Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina [Atrazina]. Buenos Aires, Argentina: Casafe – Crop Life Latin America 1: 345-348
- CASAFE - Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes** (2010). Guía de Productos Fitosanitarios para la Republica Argentina. Buenos Aires, Argentina. Disponible en: www.casafe.org.ar
- Casamayor E.O., Ferrera I., Cristina X., Borrego C.M., Gasol J.M.** (2007). Flow Cytometric Identification and Enumeration of Photosynthetic Sulfur Bacteria and Potential for Ecophysiological Studies at the Single-Cell Level Complex Ecophysiological Experiments With Photosynthetic Sulfur Bacteria In Mixed Cultures and Natural. *Environmental Microbiology* 9(8): 1969-1985
- Cessna A.J., Elliott J.A.** (2004). Seasonal Variation of Herbicide Concentrations in Prairie Farm Dugouts. *Journal of Environmental Quality* 33(1): 302-315
- CEU- Council of European Union** (2003). Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council Concerning the Quality of Bathing Water. *Official Journal of the European Union* (2003/C 45 E/15)
- Cheng G., Shapir N., Sadowsky M.J., Wackett L.P.** (2005). Allophanate Hydrolase, Not Urease, Functions in Bacterial Cyanuric Acid Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* 71(8): 4437-4445
- Chevrier C., Limon G., Monfort C., Rouget F., Garlantézec R., Petit C, Durand G., Cordier S.** (2011). Urinary Biomarkers of Prenatal Atrazine Exposure and Adverse Birth Outcomes in the PELAGIE Birth Cohort. *Environ Health Perspect* 119: 1034-1041
- Chinalia F.A., Regali-Seleghin M.H., Correa E.M.** (2007) 2,4-D Toxicity: Cause, Effect and Control. Review. *Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology* 1(2): 24-33
- Chiroles Rubalcaba S., González González M.I., Torres Rojas T., Valdés Aguila M., Domínguez Martínez I.** (2007). Bacterias Indicadoras de Contaminación Fecal en Aguas del río Almendares (cuba). *Higiene y Sanidad Ambiental* 7: 222-227
- Cole J.J.** (1999). Aquatic Microbiology for Ecosystem Scientists: New and Recycled Paradigms in Ecological Microbiology. *Ecosystems* 2: 215-225
- Corral M., Rodríguez A., Oroná C., Bazán R., Cossavella A., Del Olmo S., Rodríguez M.I., Larrosa N., Bonfanti E., Busso F.** (2004). Simulación Numérica de Procesos de Transporte y de Calidad del Agua

en el Embalse Los Molinos. Mecánica Computacional XXIII: 1215-1232. Eds G.Buscaglia, E.Dari, O.Zamonsky Bariloche, Argentina

- Cossavella A.**, Rodríguez M.I., Rodríguez A., Avena M., Oroná C., Larrosa N., Muñoz A., Moya G., Bertucci C., Miatello F., Bazán R., Martínez M. (2001). Monitoreo de Calidad de Agua y Sedimentos del Embalse Los Molinos I-Córdoba. III Taller Internacional sobre Enfoques Regionales para el Desarrollo y la Gestión de Embalses de la Cuenca del Río de la Plata. Posadas, Misiones, Argentina.
- Cossavella A.** (2003). Influencia de Efectos Antrópicos y Naturales en el Proceso de Eutroficación de las Aguas del Embalse Los Molinos. Tesis de Maestría. Córdoba, Argentina: Facultad de Ingeniería. UTN, 600 pp.
- Cupples A.M.**, Spormann A.M., McCarty P.L. (2004). Vinyl Chloride and *cis*-dichloroethene Dechlorination Kinetics and Microorganism Growth under Substrate Limiting Conditions. *Environmental Science and Technology* 15:1102-1107
- Daugherty D.D.**, Karel S.F. (1994). Degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid by *Pseudomonas cepacia* DBOI (pRO101) in a Dual-Substrate Chemostat. *Applied and Environmental Microbiology* 60(9):3261-3267
- Davey H.M.**, Kell D.B. (1996). Flow Cytometry and Cell Sorting of Heterogeneous Microbial Populations: the Importance of Single-Cell Analyses. *Microbiological Reviews* 60(4): 641-696
- Davey H.M.** (2011). Life, Death, and In-Between: Meanings and Methods in Microbiology. *Applied and Environmental Microbiology* 77(16): 5571-5576
- Davey H.M.**, Hexley P. (2011). Red but not dead? Membranes of Stressed *Saccharomyces cerevisiae* are Permeable to Propidium Iodide. *Environmental Microbiology* 13(1): 163-171
- Dayan F.E.**, Duke S.O., Grossmann K. (2010). Herbicides as Probes in Plant Biology. *Weed Science* 58:340-350
- Ddidigwu Nwani C.**, Singh Lakra W., Sahebrao Nagpure N., Kumar R., Kushwaha B., Kumar Srivastava S. (2010). Toxicity of the Herbicide Atrazine: Effects on Lipid Peroxidation and Activities of Antioxidant Enzymes in the Freshwater Fish *Channa punctatus* (Bloch). *International Journal of Environmental and Research on Public Health* 7: 3298-3312
- De Wever A.**, Muylaert K., Van der Gucht K., Pirlot S., Cocquyt C., Descy J-P., Plisnier P-D., Vyverman W. (2005). Bacterial Community Composition in Lake Tanganyika: Vertical and Horizontal Heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology* 71(9): 5029-5037
- del Giorgio P.A.**, Cole J.J. (1998). Bacterial Growth Efficiency In Natural Aquatic Systems. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29:503-541
- Díaz-Raviña M.**, Bååth E. (1996). Development of Metal Tolerance in Soil Bacterial Communities Exposed to Experimentally Increased Metal Levels. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2970-2977
- Diez M.C.** (2010). Biological Aspects Involved in The Degradation of Organic Pollutants. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 10(3): 244-267
- Di Guardo A.**, Williams (1994). A Fugacity Model of Pesticide Runoff to Surface Water: Development and Validation. *Chemosphere* 28(3): 511-531

- Domínguez A.**, Bedano J.C., Becker A.R. (2009). Cambios en la Comunidad de Lombrices de Tierra (Annelida: Lumbricina) como Consecuencia del Uso de la Técnica De Siembra Directa en el Centro-Sur De Córdoba, Argentina. *Ciencias del Suelo* 27(1): 11-19
- Donatti O.**, Reartes J. (1997). Diagnóstico del Estado Trófico del Embalse Los Molinos. Subsecretaría del Ambiente de la Municipalidad de Córdoba–29 pp.
- Drovandi A.**, J. Zuluaga M., Filippini A., Bermejillo P., Peralta M., Bustamante A., Ruiz M., Granero A., Morsucci M., Velgas A., Valdes N. (2005). Diagnóstico Preliminar del Estado Trófico del Embalse El Carrizal, Provincia de Mendoza. XX Congreso Nacional del Agua y III Simposio de Recursos Hídricos del Cono Sur. Mendoza, Argentina.
- Dubus I.G.**, Barriuso E., Calvet R. (2001). Sorption of Weak Organic Acids in Soils: Clofencet, 2,4-D and Salicylic Acid. *Chemosphere* 45: 767-774
- Edwards M.L.**, Lilley A.K., Timms-Wilson T.H., Thompson I.P., Cooper I. (2001). Characterisation of the Culturable Heterotrophic Bacterial Community in a Small Eutrophic Lake (Priest Pot). *FEMS Microbiology Ecology* 35: 295-304
- Eiler A.**, Langenheder S., Bertilsson S., Tranvik L.J. (2003). Heterotrophic Bacterial Growth Efficiency and Community Structure at Different Natural Organic Carbon Concentrations. *Applied and Environmental Microbiology* 69(7): 3701-3709
- EPA-** U.S. Environmental Protection Agency. (2002). Implementation Guidance for Ambient Water Quality Criteria for Bacteria. EPA/823/B-02/003. Disponible en: <http://www.epa.gov/ostwater/standards/bacterial/>
- EPA-**Environmental Protection Agency (2005). Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7508C). Re-registration Eligibility Decision for 2,4-D (738-R-05-002). Disponible en: http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/24d_red.pdf
- EPA-** U.S. Environmental Protection Agency (2006). Decision Documents for Atrazine. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Disponible en: http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/atrazine_combined_docs.pdf
- EPA-** U.S. Environmental Protection Agency (2007). Preliminary Interpretation of the Ecological Significance of Atrazine Stream-water Concentrations Using a Statistically Designed Monitoring Program. EPA-HQ-OPP-2007-0934-0004. Disponible en http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2007/december/whitepaper_sap.pdf
- Falkenmark M.** (2003). Water Management and Ecosystems: Living with Change. Global Water Partnership. Technical Committee. Disponible en: <http://www.gwpforum.org/gwp/library/TEC%209.pdf>
- Ferrari M.J.**, Ator S.W., Blomquist J.D., Dysart J.E. (1997). Pesticides in Surface Water of the Mid-Atlantic Region. U.S. Geological Survey 1997. http://md.water.usgs.gov/publications/wrir-97-4280/wrir_97_4280_html.html
- Fisher M.M.**, Klug J.L., Lauster G., Newton M., Triplett E.W. (2000). Effects of Resources and Trophic Interactions on Freshwater Bacterioplankton Diversity. *Microbial Ecology* 40:125-138
- Folabella A.M.**, Escalante A.H., Deza A., Perez Guzzi J., Zamora A.S. (2006). Indicadores Bacterianos de Calidad de Agua Recreacional en la Laguna de Los Padres (Buenos Aires, Argentina). 1° Congreso Internacional sobre Gestión y Tratamiento Integral del Agua. Abril. Córdoba, Argentina

- Foley E., Sigler V., Gruden C.L.** (2008). A Multiphasic Characterization of the Impact of the Herbicide Acetochlor on Freshwater Bacterial Communities. *The ISME Journal* 2, 56-66
- Ford T.** (1994). Pollutant Effect on Microbial Ecosystem. *Environmental Health Perspectives* 102: 45-48
- Fraç M., Oszust K., Lipiec J.** (2012). Community Level Physiological Profiles (CLPP), Characterization and Microbial Activity of Soil Amended with Dairy Sewage Sludge. *Sensors* 12: 3253-3268
- Frias-Lopez J., Shi Y., Tyson G.W., Coleman M.L., Schuster S.C., Chisholm S.W., DeLong E.F.** (2008) Microbial Community Gene Expression in Ocean Surface Waters. *PNAS* 105(10): 3805-3810
- Gamo M., Shoji T.** (1999). A Method of Profiling Microbial Communities Based on a Most-Probable-Number Assay that Uses BIOLOG Plates and Multiple Sole Carbon Sources. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4419-4424
- García-Gonzalez V., Govantes F., Shaw L.J., Burns R.G., Santero E.** (2003). Nitrogen Control of Atrazine Utilization in *Pseudomonas* sp. Strain ADP. *Applied and Environmental Microbiology* 69(12): 6987-6993
- Garland J.L., Mills A.L.** (1991) Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Patterns of Community-level Sole-carbon-source Utilization. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2351-2359
- Garland J.L.** (1996) Analytical Approaches to the Characterization of Samples of Microbial Communities Using Patterns of Potential C Source Utilization. *Soil Biology and Biochemistry* 28:213-221
- Garland J.L.** (1997) Analysis and Interpretation of Community-Level Physiological Profiles in Microbial Ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 24: 289-300
- Garland J. L.** (1999). Potential and Limitations of BIOLOG for Microbial Community Analysis. *Methods of Microbial Community Analysis. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology* Bell, Brylinsky, Johnson-Green (Ed). Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- Gasol J.M., Zweifel U.L., Peters F., Furhman J.A., Hagström Å.** (1999). Significance of Size and Nucleic Acid Content Heterogeneity as Measured by Flow Cytometry in Natural Planktonic Bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 65: 4475-4483
- Gasol J.M., del Giorgio P.A.** (2000). Using Flow Cytometry for Counting Natural Planktonic Bacteria and Understanding the Structure of Planktonic Bacterial Communities. *Scientia Marina* 64(2): 197-224
- Gaultier J., Farenhorst A., Crow G.** (2006). Spatial Variability of Soil Properties and 2,4-D Sorption in a Hummocky Field as Affected by Landscape Position and Soil Depth. *Canadian Journal of Soil Science* 86(1): 89-95
- Gebendinger N., Radosevich M.** (1999) Inhibition of Atrazine Degradation by Cyanazine Exogenous Nitrogen in Bacterial Isolate M91-3. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51: 375-381
- Godoy F., Zenteno P., Cerda F., González B., Martínez M.** (1999). Tolerance to Trichlorophenols in Microorganisms from a Polluted and a Pristine Site of a River. *Chemosphere* 38(3): 655-662
- Gonzalez A.M., Paranhos R., Lutterbach M.S.** (2006). Heterotrophic Bacteria Abundances in Rodrigo de Freitas Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil). *Brazilian Journal of Microbiology* 37: 428-433
- Gonzalez Rueda C.** (2009). Thèse de la Maîtrise en Biologie. Effets de la Matière Organique Dissoute Sur La Croissance des Espèces de Cyanobactéries à la Baie Missisquoi du Lac Champlain. Université du Québec à Montréal, Canada.

- Gorshkov** V.G., Makarieva A.M., Gorshkov V.V. (2004). Revising the Fundamentals of Ecological Knowledge: the Biota–Environment Interaction. *Ecological Complexity* 1: 17-36
- Goss** D.W. (1992). Screening Procedure for Soils and Pesticides for Potential Water Quality Impacts. *Weed Technology* 6: 701-708
- Granero** M., Bustamante A., López F., Ruiz M. (2004). Hypolimnion Water Quality and its Relationship to Internal P-Loading in an Eutrophicated Water Body: San Roque reservoir (Córdoba, Argentina). *Journal of Hydraulic Research* 42: 310-315
- Graymore** M., Stagnitti F., Allison G. (2001). Impacts of Atrazine in Aquatic Ecosystem. *Environmental international* 26: 483-495
- Hacioglu** N., Dulger B. (2009). Monthly Variation of some Physico-chemical and Microbiological Parameters in Biga Stream (Biga, Canakkale, Turkey) *African Journal of Biotechnology* 8 (9): 1929-1937
- Hahn** M.W., Höfle M.G. (2001). MiniReview. Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 35: 113-121
- Hang** S., Sereno R. (2002) Adsorción de Atrazina y su Relación con las Características Sedimentológicas y el Desarrollo del Perfil de Dos Suelos de la Provincia de Córdoba. *INTA, Argentina RIA* 31(3): 73-87
- Hang** S., Barriuso E, Houot J S. (2003). Behavior of ¹⁴C-Atrazine in Argentinean Topsoils under Different Cropping Managements. *Environmental Quality* 32: 2216-2222
- Hang** S., Houot S., Barriuso E. (2007). Vertical Variation of Atrazine Mineralization Capacity in Soils. *Agriscientia* XXIV (2): 87-95
- Harsha** T.S., Yamakanamardi S.M., Mahadevaswamy M. (2007). Heterotrophic Free-living and Particle-bound Bacterial Cell Size in the River Cauvery and its Downstream Tributaries. *Journal of Bioscience* 32(2): 63-374
- Helling** C.S. (2005). The Science of Soil Residual Herbicides. p.p 3-22. Ed Van Acker, R.C. en *Soil Residual Herbicides: Science and Management. Topics in Canadian Weed Science* 3. Quebec, Canada
- Heip** C.H.R., Herman P.M.J., Soetaert K. (1998). Indices of Diversity and Evenness. *Oceanis* 24(4): 61-87
- Hidalgo Ortiz**, C. (1999). Tesis Doctoral: Simplificación del Tratamiento de Muestras en el Análisis de Residuos de Herbicidas en Aguas Mediate Aplicaciones de las Técnicas Cromatograficas Acopladas LC-LC y SPE-LC- Universitat Jaume I, Barcelona, España.
- Hoffman** R.A. (2008). Flow Cytometry: Instrumentation, Applications, Future Trends and Limitations. Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements II Springer Series on Fluorescence Volume 6: 307-342
- Hornsby** A.G. (1992). Site-specific Pesticide Recommendations: the Final Step in Environmental Impact Prevention. *Weed Technology* 6 :736-742
- IARC-** International Agency for Research on Cancer (2013). Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Publications/techrep42/TR42-19.pdf>
- IARC-** International Agency for Research on Cancer (2011). Monograph on the Evaluation of Carcinogenic of phenoxy herbicides. Disponible en <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/suppl7/Suppl7-48.pdf>
- ILEC-** International Lake Environment Committee Foundation (2005). Managing Lakes and Their Basins for Sustainable Use. Report for Lake Basin Managers and Stakeholders. Kusatsu, Japan.

- INDEC-** Instituto Nacional de Estadística y Censos (2008). Censo Agropecuario 2008. Disponible en: <http://www.indec.gov.ar/censoAgro2008/cna2008.asp>.
- INDEC-** Instituto Nacional de Estadística y Censos. (2012). Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas 2010. Censo del Bicentenario. Resultados definitivos. Serie B N°2. Tomo 1. Buenos Aires. Argentina. Instituto Nacional de Estadística y Censos. Disponible en: http://www.censo2010.indec.gov.ar/archivos/cento2010_tomo1.pdf.
- Insam H., Goberna M.** (2004). Use of Biolog® for the Community Level Physiological Profiling (CPLL) of Environmental Samples. *Molecular Microbial Ecology Manual* 2° Ed, Kluwer Academic Publisher. 853-860 pp.
- IRAM-** Instituto Argentino de Normalización y Certificación (1996). Norma 29012-2. Calidad del Medio Ambiente. Agua. Muestreo. Directivas Generales sobre Técnicas.
- IRAM-** Instituto Argentino de Normalización y Certificación. (1998) Norma 29012-3. Calidad ambiental. Calidad del agua. Muestreo. Parte 3: Guía para la Preservación y Manipulación de las Muestras.
- Jardillier L., Boucher D., Personnic S., Jacquet S., Thènot A., Sargos D., Amblard C., Debroas D.** (2005). Relative Importance of Nutrients and Mortality Factors on Prokaryotic Community Composition in Two Lakes of Different Trophic Status: Microcosm Experiments. *FEMS Microbiology Ecology* 53 429-443
- Jellett J.F., Li W.K.W., Dickie P.M., Boraie A., Keplay P.E.** (1996). Metabolic Activity of Bacterioplankton Communities Assessed by Flow Cytometry and Single Carbon Substrate Utilization. *Marine Ecology Progress Series* 136: 213-225
- Juncos R., Bistoni M. A., Zito Freyer I.** (2006). Composición y Estructura de la Ictiofauna del Río Ceballos-Saldán (Córdoba, Argentina) Iheringia, Sér. Zoologica. Porto Alegre, 96(3):363-371. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/isz/v96n3/13.pdf>
- Jurgensen T.A., Hoagland K.D.** (1990). Effects of Short Term Pulses of Atrazine on Attached Communities in a Small Stream. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 19: 617-623
- Kamitani T., Oba H., Kaneko N.** (2006). Microbial Biomass and Tolerance of Microbial Community on an Aged Heavy Metal Polluted Floodplain in Japan. *Water, Air and Soil Pollution* 172: 185-200
- Kay D., Fleisher J.M., Godfree A.F., Jones F., Salmon R., Shore R., Wyer M.D., Zelenauch-Jacquotte R.** (1994). Predicting Likelihood of Gastroenteritis from Sea Bathing: Results from Randomised Exposure. *Lancet* 344: 905-909
- Kemp P., Sherr B., Sherr E., Cole J.** (1993). *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Ed Lewis
- Kepner R.L; Pratt J.R.**(1994). Use of Fluorochromes for Direct Enumeration of Total Bacteria in Environmental Samples: Past and Present. *Microbiological Reviews* 58(4): 603-615
- Kinzelman J., Ng C., Jackson E., Gradus S., Bagley R.** (2003). Enterococci as Indicators of lake Michigan Recreational Water Quality: Comparison of Two Methodologies and their Impacts on Public Health Regulatory Events. *Applied and Environmental Microbiology* 69(1): 92-96
- Klein G.** (2001). Lake Restoration in Berlin. *Biopolitics International Organization*. Disponible en Lake Restoration in Berlin. Institute for Water, Soil and Air Hygiene 9
- Kolpin D.W., Kalkhoff S.J.** (1993). Atrazine Degradation in a Small Stream in Iowa. *Environmental. Science Technology* 27(1):134-139

- Komang Ralebitso** T., Senior E., van Verseveld H.W. (2002). Microbial Aspects of Atrazine Degradation in Natural Environments. *Biodegradation* 13: 11-19
- Konopka** A., Oliver L., Turco Jr R.F. (1998). The Use of Carbon Substrate Utilization Patterns in Environmental and Ecological Microbiology. *Microbial Ecology* 35: 103-115
- Kopytko** M., Chalela G., Zauscher F. (2002). Biodegradation of Two Commercial Herbicides (Gramoxone and Matancha) by the Bacteria *Pseudomonas putida*. *Journal of Biotechnology* 5: 182-195.
- Kormas** K. (2005). Bacterioplankton Growth on Extracellular Organic Carbon from Marine Microalgal Cultures. *Cahiers de Biologie Marine* 46: 241-251
- Kramer** M., Obermajer N., Bogovič Matijašić B., Rogelj I., Kmetec V. (2009). Quantification of live and Dead Probiotic Bacteria in Lyophilised Product by Real-time PCR and by Flow Cytometry. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84: 1137-1147
- Lalke-Porczyk** E., Donderski W., Malecka M. (2004). Physiological Properties and Taxonomy of Epiphytic Bacteria in Chełmżyńskie Lake in Poland. *Polish Journal of Environmental Studies* 13(5): 543-549
- LaParaa** T.M., Nakatsub C.H., Panteac L.M., Alleman J.E. (2002). Stability of the Bacterial Communities Supported by a Seven-stage Biological Process Treating Pharmaceutical Wastewater as Revealed by PCR-DGGE. *Water Research* 36: 638-646
- Larrosa** N. (2006). Identificación de Fuentes de Contaminación Fecal en el Embalse Los Molinos. Diferenciación de su Origen Humano y/o Animal. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba.
- Lebaron** P., Servais P., Agogué H., Courties C., Joux F. (2001). Does the High Nucleic Acid Content of Individual Bacterial Cells Allow Us To Discriminate between Active Cells and Inactive Cells in Aquatic Systems? *Applied Environmental Microbiology* 67(4): 1775-1782
- Lehtinen** J. (2007). Tesis Doctoral: Improvements in The Assessment Of Bacterial Viability And Killing. Department of Biochemistry and Food Chemistry University of Turku. Turku, Finland
- Li** R., Dong M., Zhao Y., Zhang L., Cui Q., He W. (2007). Assessment of Water Quality and Identification of Pollution Sources of Plateau Lakes in Yunnan (China). *Journal of Environmental Quality* 36(1): 291-297
- Mackay** D., (1979). Finding Fugacity Feasible. *Environmental Science and Technology* 13: 1218-1223
- Macnaughton** S.J., Stephen J.R., Venosa A.D., Davis G.A., Chang Y., White D.C. (1999). Microbial Population Changes during Bioremediation of an Experimental Oil Spill. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3566-3574.
- Mandelbaum** R.T., Allan D., Wackett L.P. (1995). Isolation and Characterization of a *Pseudomonas* sp. That Mineralizes the s-Triazine Herbicide Atrazine. *Applied and Environmental Microbiology* 61(4):1451-1457
- Margalef** R. (1982). *Limnología*. Barcelona: Ed.Omega.
- Martinez** M., Baezaa J., Freera J., Rodríguez J. (2000). Chlorophenol Tolerant and Degradative Bacteria Isolated from a River Receiving Pulp Mill Discharges. *Toxicological and Environmental Chemistry* 77(3-4): 159-170
- Marzorati** M., Wittebolle L., Boon N., Daffonchio D., Verstraete W. (2008). How to Get More Out of Molecular Fingerprints: Practical Tools for Microbial Ecology. *Environmental Microbiology* 10(6):1571-1581

- Massieux B.**, Boivin M.E.Y., van den Ende F.P., Langenskiold J., Marvan P., Barranguet C., Admiraal W., Laanbroek H.J., Zwart G. (2004). Analysing Structural and Physiological Profiles to Assess the Affect of Cu on Biofilm Forming Microbial Communities. *Applied Environmental Microbiology* 70: 4512-4521
- Mayer F.** (1987). *Acute Toxicity Handbook of Chemicals to Estuarine Organisms*. EPA/600/8-87/017.
- Meybeck M.**, Kuusisto E., Mäkelä A., Mälkki E. (1996). *Water Quality Monitoring - A Practical Guide to the Design and Implementation of Freshwater Quality Studies and Monitoring Programmes*. Jamie Bartram and Richard Balance Ed. United Nations Environment Programme and the World Health Organization (UNEP/WHO).
- MHD-Human Health Assessment** (2009). Atrazine. Report for the Minnesota Department of Agriculture's Pesticide Registration Review Suggested citation: Human Health Assessment. Minnesota Department of Health. Estados Unidos. <http://www.health.state.mn.us/divs/eh/risk/studies/index.html>
- Miller P.**, Westra P. (1997). *Herbicide Behavior in Soils*. Production N° 0.562. University Cooperative Extension, Colorado State University. Colorado, Estados Unidos. Disponible en https://www.erasms.com/static/wqtool/PDFs/bmps_colorado/00562.pdf
- Miner B.G.**, Sultan S.E., Morgan S.G., Padilla D.K., Relye R.A. (2005). Ecological Consequences of Phenotypic Plasticity. *TRENDS in Ecology and Evolution* 20 (12)
- Mirgain G.I.**, Green A., Monteil N.H. (1993). Degradation of Atrazine in Laboratory Microcosms: Isolation and Identification of the Biodegrading Bacteria. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12: 1627-1634
- Muller J.A.**, Rosner B.M., Von Abendroth G., Meshulam-Simon G., McCarty P.L. (2004). Spormann Molecular Identification of the Catabolic Vinyl Chloride Reductase from *D. halococcoides* sp. strain VS and Its Environmental Distribution. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 4880-4888
- Muylaert K.**, Van der Gucht K., Vloemans N., De Meester L., Gillis M. Vyverman W. (2002). Relationship between Bacterial Community Composition and Bottom-Up versus Top-Down Variables in Four Eutrophic Shallow Lakes. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 4740-4750
- Muyzer G.**, de Waal E.C, Uitierlinden A.G. (1993). Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*: 695-700
- Muyzer G.**, Smalla K. (1998). Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) in Microbial Ecology. *Antonie Leeuwenhoek* 73: 127-141
- Nadal, F.** (2010). *Propuestas de Sistemas de Remediación Sanitaria para Localidades Serranas: Caso Potrero de Garay*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- Natale O.E.**, Allevato H., Marzocca M.C., Sylvester S. (2002). Evaluación de Factores de Riesgo Debidos a Plaguicidas en el Medio Ambiente Rural. Informe (GTT 5-Programa de Riesgos Químicos-Plan de Gestión de Sustancias Químicas-Ministerio de Salud y Accion Social)-Programa Nacional de Calidad de Aguas
- Nesatyy V.J.**, Suter M.J. (2007). Proteomics for the Analysis of Environmental Stress Response in Organisms. *Environmental Science and Technology* 41: 6891-6900

- Neumann G,** Teras R, Monson L, Kivisaar M, Schauer F, Heipieper HJ. (2004). Simultaneous Degradation of Atrazine and Phenol by *Pseudomonas* sp. Strain ADP: Effects of Toxicity and Adaptation. *Applied Environmental Microbiology* 70(4):1907-1912
- Nishimura Y.,** Kim C., Nagata T. (2005). Vertical and Seasonal Variations of Bacterioplankton Subgroups with Different Nucleic Acid Contents: Possible Regulation by Phosphorus. *Applied Environmental Microbiology* 71(10): 5828-5836
- Noble R.T.,** Moore D.F., Leecaster M.K., McGee C.D., Weisberg S. B. (2003). Comparison of Total Coliform, Fecal Coliform and Enterococcus Bacterial Indicator Response for Ocean Recreational Water Quality Testing. *Water Research* 37(7): 1637-1643
- NRDC-** National Resources Defense Council (2006). Testing the Waters 2006: a Guide to Water Quality at Vacation Beaches. Disponible en: <http://www.nrdc.org/water/oceans/ttw/ttw2006.pdf>
- Ntowa W.J.,** Drechsel P., Botwec B.O., Kelderman P., Gijzend J. (2008). The Impact of Agricultural Runoff on the Quality of Two Streams in Vegetable Farm Areas in Ghana. *Journal of Environmental Quality* 37: 696-703
- Nuzzi R.,** Buhrens R. (1997). The use of Enterococcus and Coliforms in Characterizing Bathing-beach Waters. *Journal of Environmental Health* 60: 16-22
- OECD-** Organisation for Economic Co-operation and Development (2004). Guidelines for the Testing of Chemicals. Aerobic Mineralisation in Surface Water. Simulation Biodegradation Test. Test 309
- Oliver J.D.** (2005). The Viable but Nonculturable State in Bacteria. *The Journal of Microbiology* 43: 93-100
- Ordoñez O.F.,** Flores M.R., Dib J.R., Paz A., Farías M.E. (2009). Extremophile Culture Collection from Andean Lakes. Extreme Pristine Environments that Host a Wide Diversity of Microorganisms with Tolerance to UV Radiation. *Microbial Ecology* 58(3): 461-73
- Osaki K.,** Mahler J.F., Hasemann J.K., Moomaw C.R., Nicolette M.L., Nyska A. Unique Renal Tubule Changes Induced in Rats and Mice by the Peroxisome Proliferators 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and WY-1643. *Toxicologic Pathology* 29(4): 440-450
- Palma G.,** Sánchez A., Olave Y., Encina F., Palma R., Barra R. (2004). Pesticide Levels in Surface Waters in an Agricultural Forestry Basin in Southern Chile. *Chemosphere* 57: 763-770
- Pasquini A.I.,** Lecomte K.L., Depetris P.J. (2004). Geoquímica de ríos de Montaña en las Sierras Pampeanas: II. El río Los Reartes, Sierra de Comenchingones, Provincia de Córdoba *Revista de la Asociación Geológica Argentina* 59(1): 129-140
- Pathak R.K.,** Dikshit A.K. (2011). Atrazine and Human Health. *International Journal of Ecosystem* 1(1): 14-23
- Pathak R.K.,** Dikshit A.K. (2012). Atrazine and its Use. *International Journal Research Chemistry Environment* 2(1): 1-6
- Peinetti R.,** Pereyra M., Kin A., Sosa A. (1993). Effects of Cattle Ingestion on Viability and Germination Rate of Caldén (*Prosopis caldenia*) seeds. *Journal of Range Management* 46: 483-486
- Perez G.L.,** Torremorell A., Mugni H., Rodriguez P., Solange Vera M., Do Nascimento M., Allende I., Bustingorry J., Escaray R., Ferraro M., Izaguirre I., Pizarro H., Bonetto C., Morris D.P., Zagarese H. (2007). Effects of the Herbicide Roundup on Freshwater Microbial Communities: a Mesocosm Study. *Ecological Applications* 17(8): 2310-2322

- Pérez** M.C., Bonilla S., Martínez G. (1999). Phytoplankton Community of a Polymictic Reservoir, La Plata River Basin, Uruguay. *Revista Brasileira de Biología* 59(4): 535-41
- Pernthaler** J., Amann R. (2005). Fate of Heterotrophic Microbes in Pelagic Habitats: Focus on Populations *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69(3): 440-461
- Phyu** Y.L., Warne M.S., Lim R.P. (2004). Toxicity of Atrazine and Molinate to the Cladoceran *Daphnia carinata* and the Effect of River Water and Bottom Sediment on their Bioavailability. *Arch. Environmental Contamination and Toxicology* 46(3): 308-15
- Porter** K.G., Feig Y.S. (1980). The use of DAPI for Identifying and Counting Aquatic Microfloral. *Limnology and Oceanography* 25: 943-948
- Porter** J., Morris S.A., Pickup R.W. (2004) Effect of Trophic Status on the Culturability and Activity of Bacteria from a Range of Lakes in the English Lake District. *Applied and Environmental Microbiology* 70(4): 2072–2078
- Preston-Mafham** J., Boddy L., Randerson P.F. (2002). Analysis of Microbial Community Functional Diversity Using Sole-carbon-source Utilisation Profiles a Critique. *FEMS Microbiology Ecology* 42: 1-14
- Pritchard** P.H., Bourquin A.W. (1985). Microbial Toxicity Studies. Capítulo 8. Fundamentals of Aquatic Toxicology. Ed Hemisphere Publishing Corporation; 1º Edition New York, Estados Unidos, pp. 177-217
- Prüss** A. (1998). Review of Epidemiological Studies on Health Effect from Exposure to Recreational Water. *International Journal of Epidemiology* 27: 1-9
- Queiroz** S.C. N., Lazou K., Sandra P., Jardim I.C.S.F. (2004) Determination of Pesticides in Water by Liquid Chromatography-(Electrospray Ionization)-Mass Spectrometry (LC-ESI-MS) Pesticides: *Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, Curitiba* 1: 53-60
- Quilbé** R., Rousseau A.N., Lafrance P., Leclerc J., Amrani M. (2006). Selecting a Pesticide Fate Model at the Watershed Scale Using a Multi-criteria Analysis. *Water Quality Research Journal of Canada* 41(3): 283-295
- Quirós** R. (2000). La Eutroficación de las Aguas Continentales de la Argentina, pp 43-47. Fernandez Ed. El Agua en Iberoamerica: Acuíferos, Lagos y Embalses. CYTED. Subprograma XVII. Aprovechamiento y Gestión de Recursos Hídricos 147
- Radosevich** M., Traina S.J., Hao Y.L., Tuovinen O.H. (1995). Degradation and Mineralization of Atrazine by a Soil Bacterial Isolate. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 297-302
- Rajzman** N.Y., Silva Failde D. (2012). El Sector de Agroquímicos en la Argentina. IV Congreso Anual AEDA
- Rasmussen** P., Ziegler A.C. (2003). Comparison and Continuous Estimates of Fecal Coliform and *Escherichia coli* Bacteria in selected Kansas Streams, May 1999 through April 2002. Water-Resources Investigations Report 03/4056. Kansas Department of Health and Environment and Environmental Protection Agency.
- Ratcliff** A., Busse M.D., Shestak C. (2006).. Changes in Microbial Community Structure Following Herbicide (Glyphosate) Additions to Forest Soils. *Applied Soil Ecology* 34:114-124
- Reasoner** D.J., Geldreich E.E. (1985). A New Medium for the Enumeration and Subculture of Bacteria from Potable Water. *Applied Environmental Microbiology* 49:1

- Reyna S.** (2005). Plan de Gestión de los Recursos Hídricos de la Provincia de Córdoba, Argentina. Informe de Avance: Disponible en: <http://www.proditi.us.es/congreso/ponencias/PLANIFICACION.pdf>.
- Reynolds K.A.** (2002). Bioremediation: Using Microbes to Clean Up Hazardous Waste. *Water Conditioning and Purification Water* 44. Disponible en <http://www.wcponline.com/column.cfm?T=T&ID=1725&AT=T>.
- Ritchie N.J., Schutter M.E., Dick R.P., Myrold D.D.** (2000). Use of Length Heterogeneity PCR and Fatty Acid Methyl Ester Profiles to Characterize Microbial Communities in Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 66(4): 1668-1675
- Ritter L., Solomon K., Sibley P., Hall K., Keen P., Mattu G., Linton B.** (2002). Sources, Pathways, and Relative Risks of Contaminants in Surface and Groundwater: A Perspective Prepared for the Walkerton Inquiry. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 65: 1-142
- Rivera R., de Los Ríos P., Contreras A.** (2010). Relations Fecal Coliforms/ Fecal Streptococci as Indicators of the Origin of Fecal Pollution in Urban and Rural Water Bodies of Temuco, Chile. *Ciencia e Investigación Agraria* 37(2):141-149
- Rodríguez A., Avena M., Rodríguez M., Cossavella A., Oroná C., Del Olmo S., Larrosa N., Bazán R. y Corral M.** (2002). Estimación de Aportes de Nutrientes de Fósforo a los Embalses San Roque y Los Molinos en Córdoba, Argentina, e Implicancias en su Gestión. *Ingeniería. Sanitaria y Ambiental-AIDIS* 60: 45-51
- Romano, S.** (2002). *Economía, Sociedad y Poder en Córdoba. Primera Mitad del Siglo XIX*, Córdoba, Argentina. Ferreyra Editor. Córdoba, 382 pp.
- Ruibal Conti A.L.** (1997). Estimación del Nivel de Contaminación Bacteriana en el Embalse San Roque y Análisis de su Variación Temporal. Relación con Volumen, Turistas y Oxígeno Consumido. LACAR '97. 7° Conferencia Internacional sobre Conservación y Gestión de Lagos, 1997, San Martín de los Andes, Argentina.
- Ruibal A.L., Bustamante A., Granero M., López F., Girbal A., Lammel E., Simonin M. E., Busso F.** (1999). Estudio de la Evolución de la Calidad de Agua del Embalse del Dique San Roque, Córdoba Asociado al Desarrollo de Floraciones de *Ceratium*. Congreso Argentino de Grandes Presas y Aprovechamiento Hidroeléctrico, San Martín de los Andes, Argentina.
- Ruibal Conti A.L., Rodríguez M.I., Ruiz M.A., Crema N., Bustamante, M.A., Angelaccio C.M.** (2006). Evaluación Preliminar del Impacto de Cyanobacterias Tóxicas en la Salud de la Población del Perilago. 1° Congreso Internacional sobre Gestión y Tratamiento integral del agua. Córdoba, Argentina.
- Rutgers M., Breure A.M.** (1999). Risk Assessment, Microbial Communities, and Pollution-Induced Community Tolerance. *Human and Ecological Risk Assessment* 5: 661-670
- SAGPyA-** Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. (2009). Disponible en: http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/programas/economia_agraria/regionales/cordoba.php.
- SAGPyA-** Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. (2010). Agricultura - Series y estadísticas - Maíz. Disponible en <http://190.220.136.179/index.php/series-por-tema/agricultura>.
- Sarikaya R., Yilmaz M.** (2003) Investigation of Acute Toxicity and the Effect of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) Herbicide on the Behavior of the Common Carp (*Cyprinus carpio* L., 1758; Pisces, Cyprinidae) *Chemosphere* 52: 195-201

- Sarikaya**, R., Yilmaz M., Gül A. (2002). The Acute Toxic Effect of 2,4-D upon Tench (*Tinca tinca* L., 1758). Journal of the Institute of Science and Technology of Gazi University 15, 289-296
- Sass** J.B., Colangelo A. (2006). European Union Bans Atrazine, While the United States Negotiates Continued Use. Vol. 12 (3). Disponible en:www.ijoh.com
- Schauer** M., Balague V., Pedros-Alio C., Massana R. (2003). Seasonal Changes in the Taxonomic Composition of Bacterioplankton in a Coastal Oligotrophic System. Aquatic Microbial Ecology 31: 163-174
- Scheffer** M., Carpenter S., Foley J.A. (2001). Catastrophic Shifts in Ecosystems. Nature 413: 591-596
- Seffernick** J.R.L., Johnson G., Sadowsky M.J., Wackett L.P. (2000). Substrate Specificity of Atrazine Chlorohydrolase and Atrazine-Catabolizing Bacteria. Applied and Environmental Microbiology 66(10): 4247-4252
- Sene** L., Converti A., Ribeiro Secchi G.A., de Cássia Garcia Simão R. (2010). New Aspects on Atrazine Biodegradation. Brazilian Archives of Biology And Technology 53(2): 487-496
- Servais** P., Agogue H., Courties C., Joux F., Lebaron P. (2001). Are the Actively Respiring Cells (CTC+) those Responsible for Bacterial Production in Aquatic Environments? FEMS Microbiology Ecology 35: 171-179
- Severi-Aguiar** G.D.C., Silva-Zacarin E.C.M. (2012). Effects of Herbicide Atrazine in Experimental Animal Models. Herbicides: Properties, Synthesis and Control of Weeds, Ed. Mohammed Naguib Abd El-Ghany Hasaneen
- Shaffer** E., Pirnie M., Sims G., Cupples A.M., Smyth C., Chee-Sanford J. (2008). Atrazine Biodegradation as Related to the Physicochemical Properties of a Cisne Soil from a Major Atrazine Spill Site. Proceedings of the Annual International Conference on Soils, Sediments, Water and Energy. Remediation 13(28)
- Shapir** N., Mongodin E.F., Sadowsky M.J., Daugherty S.C., Nelson K.E., Wackett L.P. (2007). Evolution of Catabolic Pathways: Genomic Insights into Microbials-Triazine Metabolism. Journal of Bacteriology 189(3): 674-682
- Shibata** T., Solo-Gabriele H.M., Fleming L.E., Elmir S. (2004). Monitoring Marine Recreational Water Quality Multiple Microbial Indicators in an Urban Tropical Environment. Water Research 38 (13): 3119-3131
- Singh** B.K., Walker A. (2006). Microbial Degradation of Organophosphorus Compounds. FEMS Microbiology Reviews 30: 428-471
- Singh** S.K., Ramaiah N. (2011). Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Profiling of Bacterial Communities Composition in Arabian Sea. Journal of Environmental Biology 32: 339-346
- Smith** E.M., del Giorgio P.A. (2003). Low Fractions of Active Bacteria in Natural Aquatic Communities? Aquatic Microbial Ecology 31: 203-208
- Smith** D., Alvey S., Crowley D.E. (2005). Cooperative Catabolic Pathways within an Atrazine-degrading Enrichment Culture Isolated from Soil. FEMS Microbiology Ecology 53: 265-273
- Sneath** P.H.A., Sokal R.R. (1973). Numerical Taxonomy. Ed Freeman, San Francisco, Estados Unidos
- Solomon** K.R., Baker D.B., Richards R.P., Dixon K.R., Klaine S.J., La Point T.W., Kendall R.J., Weisskopf C.P., Giddings J.M., Giesy J.P., Hall L.W., Williams W.M. (1996). Ecotoxicological Risk Assessment of Atrazine in North American Surface Waters. Environmental Toxicology and Chemistry 15(1): 31-76

- Sonthiphand P., Neufeld J.D.** (2013) Evaluating Primers for Profiling Anaerobic Ammonia Oxidizing Bacteria within Freshwater Environments. *PLoS One* 8(3): e57242
- SRHN-** Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación (2003). Desarrollos de Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente Correspondientes a Nitratos y Nitritos.
- SRHN-** Secretaría de Recursos Hídricos de la Nación (2005). Nivel Guía de Calidad de Agua y Ambiente para Protección de la Biota Acuática- 2,4-D. Argentina. Disponible en <http://www.hidricosargentina.gov.ar/pdfs/2,4-D.pdf>
- SRHN-** Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación (2005). Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua. República Argentina. http://hidricos.obraspublicas.gov.ar/calidad_del_agua_actividades.htm
- SRHN** Subsecretaría de Recursos Hídricos. Plan de Recursos Hídricos- Taller Provincial: Plan de Gestión de los Recursos Hídricos de la Provincia de Córdoba (2007). Disponible en <http://www.hidricosargentina.gov.ar/documentos/CORDOBA-preliminar.pdf>
- Sträuber H., Müller S.** (2010). Viability States of Bacteria specific Mechanisms of Selected Probes. *Cytometry* 77(A): 623-634
- Struthers J.K., Jayachandran K., Moorman T.B.** (1998). Biodegradation of Atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and Use of this Strain in Bioremediation of Contaminated Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (9): 3368-3375
- Stürtz N., Deis R.P., Jahn G.A., Duffard R., Evangelista de Duffard A.M.** (2008). Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on Rat Maternal Behavior. *Toxicology* 247(2-3): 73-79
- Suárez Pita M.** (2002). Tendencia Actual del Estreptococo como Indicador de Contaminación Fecal. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* 49: 38-43
- Sun C-C., Wang Y-S., Wu M-L., Dong J-D., Wang Y-T., Sun F-L., Zhang Y-Y.** (2011). Seasonal Variation of Water Quality and Phytoplankton Response Patterns in Daya Bay, China. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8
- Tanabe A., Kawata K.** (2004) Determination of Triazine Pesticides and Related Compounds in Environmental Water by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Analytical Sciences* 20(1): 227-230
- Tappe W., Groeneweg J., Jantsch B.** (2002). Diffuse Atrazine Pollution in German Aquifers. *Biodegradation* 13: 3-10
- Theron J., Cloete T.E.** (2000). Molecular Techniques for Determining Microbial Diversity and Community Structure in Natural Environments. *Critical Review in Microbiology* 26(1): 37-57
- Tillitt D.E., Papoulias D.M., Whyte J.J., Richter C.A.** (2010). Atrazine Reduces Reproduction in Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology* 99(2): 149-159
- Top E.M.; Holben W.E., Forney L.J.** (1995). Characterization of Diverse 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid-Degradative Plasmids Isolated from Soil by Complementation. *Applied and Environmental Microbiology* 61(5):1691-1698
- Topp E., Zhu H., Nour S.M., Houot M., Lewis S., Cuppels D.** (2000) Characterization of an Atrazine-Degrading *Pseudaminobacter* sp. Isolated from Canadian and French Agricultural Soils. *Applied and Environmental Microbiology* 66(7): 2773-2782

- UNESCO**- Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (2006). The 2nd United Nation World Water Development Report: Water, a Shared Responsibility. Disponible en http://www.unesco.org/water/wwap/wwdr/wwdr2/table_contents.shtml.
- van Straalen** N.M., van Gestel C.A.M. (2008). A Stress Ecology Framework for Comprehensive Risk Assessment of Diffuse Pollution. *Science of the Total Environment* 406: 479-483
- Vázquez** J., Miatello R., Roque M. (1979). Vegetación. Geografía Física de la Provincia de Córdoba. Ed. Boldt, Buenos Aires, Argentina.
- Victorio** L., Gilbride K.A., Allen D.G., Liss S.N. (1996). Phenotypic Fingerprinting of Microbial Communities in Wastewater Treatment Systems. *Water Research* 30: 1077-1086
- Vieublé Gonod** L., Martin-Laurent F., Chenu C. (2006). 2,4-D Impact on Bacterial Communities, and the Activity and Genetic Potential of 2,4-Degrading Communities in Soil. *FEMS Microbiology Ecology* 58: 529-537
- Vinebrooke** R.D., Cottingham K., Norberg J., Scheffer M., Dodson S., Maberly S., Sommer U. (2004). Impacts of Multiple Stressors on Biodiversity and Ecosystem. *Oikos* 104: 451-457.
- Volmer Buffa** E., Ratto S.E. (2005). Disponibilidad de Cinc, Cobre, Hierro y Manganeso Extraíble con DTPA en Suelos de Córdoba (Argentina) y Variables Edáficas que la Condicionan. *Ciencias del Suelo* 23 (2): 107-114
- Von Mering** C., Hugenholtz P., Raes J., Tringe S.G., Doerks T., Jensen L.J., Ward N., Bork P. (2007). Quantitative Phylogenetic Assessment of Microbial Communities in Diverse Environments. *Science* 315
- Wackett** L.P., Sadowsky M.J., Martinez B., Shapir N. (2002). MINI-REVIEW. Biodegradation of Atrazine and Related S-Triazine Compounds: From Enzymes to Field Studies. *Appl Microbiol Biotechnol* 58: 39-45
- Wade** T., Calderon R.L., Same E., Beach M., Brenner K.P., Williams A.M., Dufour A. (2006). Rapidly Measured Indicators Recreational Water Quality Are Predictive of Swimming-Associated Gastrointestinal Illness. *Environmental Health Perspectives* 114: 24-28.
- Wang** Y. (2008). The unseen majority: Heterotrophic Bacteria in Freshwater, More than Just Small and Non-Cultivable. ETH, Zürich, Suiza.
- Want** A.J. (2010). Physiological Studies on Bacterial Fermentations Using Multi-Parameter Flow Cytometry. A Ph.D Thesis The University of Birmingham, Inglaterra.
- Ward** G.S., Ballantine L. (1985). Acute and Chronic Toxicity of Atrazine to Estuarine Fauna. *Estuaries* 8: 22-27
- White** C. (2012). Understanding water scarcity. Definitions and Measurements. Global Water Forum. Disponible en: http://www.iwmi.cgiar.org/news_room/pdf/Understanding_water_scarcity.pdf.
- Whitman** R., Nevers M. (2008). Summer *E. coli* Patterns and Responses along 23 Chicago Beaches. *Environmental Science and Technology* 42: 9217-9224
- WHO**- World Health Organization(1996). Guidelines for Drinking-Water Quality. Volume 2
- WHO**- World Health Organization (2003). 2,4-D and Atrazine in drinking-water. Guías de la OMS para la calidad del agua potable. Ginebra, Suiza. (WHO/SDE/WSH/03.04/32). Disponible en: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/wsh0304_32/en/index.html

- WHO-** World Health Organization (2003). Guidelines for Recreational Water Environments. Coastal and Fresh Waters. Chapter 4: Faecal Pollution and Water Quality. Geneva Vol. 1
- Wong** P.K. (2000). Effects of 2,4-D, Glyphosate and Paraquat on Growth, Photosynthesis and Chlorophyll-a Synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. *Chemosphere* 41(1-2): 177-182
- Wu** M., Quirindongo M., Sass J., Wetzler A. (2009) Poisoning the Well: How the EPA Is Ignoring Atrazine Contamination in Surface and Drinking Water in the Central United States. Ed. Natural Resources Defense Council - NRDC.
- Wu** X., Monchy S., Taghavi S., Zhu W., Ramos J., van der Lelie D. (2011). Comparative Genomics and Functional Analysis of Niche-specific Adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiology Reviews* 35(2): 299-323
- Yanze-Kontchou** C., Gschwind N. (1994). Mineralization of the Herbicide Atrazine as a Carbon Source by a *Pseudomonas* Strain. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 4297-4302
- Yokokawa** T., Nagata T. (2005) Growth and Grazing Mortality Rates of Phylogenetic Groups of Bacterioplankton in Coastal Marine Environments. *Applied and Environmental Microbiology* 71(11): 6799-6807
- Yu** W., Walter K., Dodds M., Banks K., Skalsky J., Strauss E.A. (1995). Optimal Staining and Sample Storage Time for Direct Microscopic Enumeration of Total and Active Bacteria in Soil with Two Fluorescent Dyes. *Applied and Environmental Microbiology* 61(9): 3367-3372
- Zabaloy** M.C., Garland J.L., Gomez M.A. (2010). Assessment of the Impact of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on Indigenous Herbicide-degrading Bacteria and Microbial Community Function in an Agricultural soil *Applied Soil Ecology*. *Applied Soil Ecology* 46(2): 240-246
- Zengler** K. (2009). Central Role of the Cell in Microbial Ecology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73(4): 712-729
- Zipper** C., Bolliger C., Fleischmann T., Suter M. J., Angst W., Müller M.D., Kohler H-P.E. (1999). Fate of the Herbicides Mecoprop, Dichlorprop, and 2,4-D in Aerobic and Anaerobic Sewage Sludge as Determined by Laboratory *Batch* Studies and Enantiomer-specific Analysis. *Biodegradation* 10: 271-278

Sitios de Agencias nacionales e internacionales en Internet visitadas:

Aguas Cordobesas. Noticias. Disponible en: <http://www.aguascordobesas.com>

Centre for Environmental Modelling and Chemistry. Trent University. Canadá. SoilFug Model. Disponible en: <http://www.trentu.ca/academic/aminss/envmodel/models/SoilFug.html> (October 29, 2008).

EXTOXNET- Extension Toxicology Network (1993) Movement of Pesticides in the Environment. A Pesticide Information Project of Cooperative Extension Offices of Cornell University, Michigan State University, Oregon State University, and University of California. Disponible en <http://extoxnet.orst.edu/tibs/movement.htm>

Gobierno de la Provincia de Córdoba. Censo Poblacional 2001. Disponible en: http://www.cordobaciudad.com/poblacion_localidades decordoba.htm

Health Canada (1993). Disponible en www.hc-sc.gc.ca

Ribosomal Database Project II. Disponible en <http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>

INTA- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (2003). Recursos Naturales de la Provincia de Córdoba.
Los suelos. INTA EEA Manfredi y la Agencia Córdoba Ambiente