

Peces como bioindicadores para el monitoreo de sistemas fluviales: análisis desde el nivel individual al comunitario



PEDECIBA-Biología
Subárea: Zoología

Lic. Daniela Olsson

Orientador: Dr. Walter Norbis

Laboratorio de Fisiología de la Reproducción y Ecología de Peces. Instituto de Biología Animal, Departamento de Biología Animal. Facultad de Ciencias, UdeLaR.

Co-orientador: Dr. Franco Teixeira de Mello

Departamento de Ecología y Gestión Ambiental. Centro Universitario Regional Este - UdeLaR.



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Tribunal Evaluador

Presidente: Dr. Wilner Martínez López, Laboratorio de Epigenética e Inestabilidad Genómica,
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Vocales: Dr. Marcelo Loureiro, Departamento de Ecología y Evolución, Facultad de Ciencias-
UdelaR

Dr. Javier García, Grupo de Biodiversidad, Centro Universitario Regional Este - UdeLaR

Índice

	Página
Introducción General	
Introducción	4
Objetivo general e Hipótesis	6
Estrategia	6
Capítulo I: Análisis del efecto de uso del suelo a nivel comunitario	
Introducción	8
Objetivos e Hipótesis	10
Materiales y Métodos	
Área de estudio	10
Usos del suelo	11
Muestreo de peces	12
Análisis de datos	13
Análisis estadístico	14
Resultados	15
Discusión	26
Capítulo II: Análisis del efecto de uso del suelo a nivel poblacional	
Introducción	32
Objetivos e Hipótesis	34
Materiales y Métodos	
Especie centinela	34
Área de estudio	35
Muestreo de peces y procesamiento de muestras	35
Análisis de datos	35
Análisis estadístico	36
Resultados	36
Discusión	42
Capítulo III: Análisis del efecto de uso del suelo a nivel de individuo	
Introducción	46
Objetivos e Hipótesis	48
Materiales y Métodos	
Área de estudio y colecta de muestras	49
Procesamiento y análisis de muestras	49
Análisis estadístico	51
Resultados	52
Discusión	59
Conclusiones	64
Anexo	66
Bibliografía	67

Introducción General

Introducción

Los sistemas fluviales cumplen distintos roles sirviendo como hábitat y corredores para la biota y como lugares para la transformación y adsorción de contaminantes y otras sustancias químicas (Poole, 2002; Allan, 2004; Allan y Castillo, 2007). Estos ecosistemas están especialmente sujetos a múltiples presiones ambientales como la extracción de agua, el vertido de efluentes industriales y domésticos, la propagación de especies invasoras, alteración de la hidrología, degradación del hábitat y la sobreexplotación de recursos (Bonilla et al., 2005; Allan y Castillo, 2007; Burrell et al., 2013; Wilson et al., 2014; Valesini et al., 2017). El agotamiento de recursos como el agua y la erosión del suelo y la extinción de vida silvestre, son parte del proceso de degradación ambiental (Fahrig, 2003; Röhrig et al., 2007; Zurrita et al., 2015; Grizzetti et al., 2017).

Particularmente los ríos y arroyos son los receptores finales de las actividades humanas sobre sus cuencas de drenaje, por lo que su análisis representa una evaluación directa de la calidad de agua y de los sistemas de gestión que se implementan a lo largo de ellas (Murry y Farrell, 2014). Las fuentes no puntuales de contaminación como la agricultura (Richards et al., 1996; Skinner et al., 1997; Alexandre et al., 2010) y el aumento de las áreas urbanizadas e industriales, causan efectos acumulativos a largo plazo sobre los ecosistemas acuáticos (Alexandre et al., 2010). En general, se acepta a la ganadería extensiva como más compatible con la conservación de la biodiversidad y los suelos en relación a la agricultura a gran escala y a la urbanización (Cingolani et al., 2008). Sin embargo, si se compara la ganadería extensiva con la exclusión completa de actividades agropecuarias como en el caso de las áreas protegidas, la ganadería resulta perjudicial o relativamente neutra en cuanto a efectos adversos sobre los ecosistemas acuáticos (Cingolani et al. 2002; Cingolani et al., 2008), por su parte la urbanización, en todo contexto se considera la actividad más perjudicial para el ecosistema (Perevolotsky y Seligman, 1998; McIntyre et al., 2003).

Determinar los efectos de las diferentes actividades humanas sobre los sistemas acuáticos es uno de los problemas más relevantes en el campo de la ecotoxicología (Van den Brink, 2008; Wilson et al., 2014; Feld et al., 2016). Desde el punto de vista de la ecología la diversidad de especies en estos ecosistemas cobra mayor relevancia debido a que cada especie que lo conforma responde de manera diferente a los mismos compuestos y niveles de exposición dada la sensibilidad y capacidad adaptativa de cada especie (Baird y Van den Brink, 2007; Van den Brink, 2008, Wilson et al., 2014; Giltrap et al., 2017). Dicha diversidad interactúa a través de flujos de materia en una red trófica, la cual es característica del ecosistema y puede ser fácilmente alterada o modificada sin que a primera vista se aprecie un daño a nivel comunitario en el corto plazo, pero, a largo plazo, los efectos pueden aparecer y modificar la estructura de las comunidades generando un gradiente de impacto como respuesta a los cambios ambientales (Alexandre et al., 2010; Feld et al., 2016; Grizzetti et al., 2017). En este sentido, a diferentes niveles de organización jerárquico se observan diferentes efectos sobre los organismos que allí habitan, característica que se emplea como herramienta de monitoreo biológico o biomonitoreo (Zaldívar et al., 2008; Alexandre et al., 2010; Giltrap et al., 2017).

Los efectos crónicos derivados de diversos impactos sobre la salud del ambiente se inician en los niveles de organización biológica más bajos a nivel de individuo evidenciándose con cambios a nivel molecular, los cuales se manifiestan de manera temprana (Sotil et al., 2007; Dursinska y Collins, 2008; Hayashi, 2016) y pueden revertirse (Murry y Farrell, 2014). Con el incremento del impacto y el paso del tiempo, dependiendo de la maquinaria de reparación y adaptación de los individuos, tendrá lugar una secuencia de alteraciones en niveles de organización más complejos, desde el individual, el poblacional, hasta llegar a generar efectos a nivel comunitario (Bucheli y Fent, 1995; Melancon, 1995). A mayor nivel de organización jerárquico, la sensibilidad, especificidad y precisión de las respuestas suelen disminuir, mientras que la relevancia ecológica aumenta (Adams et al., 1989; Carignan y Villard, 2002; Siddig et al., 2016).

Uno de los modelos en vertebrados más utilizado para el monitoreo acuático son los peces, ya que los mismos abarcan una variedad de grupos tróficos (detritívoros a piscívoros), diferentes modos de reproducción (ovíparos a vivíparos), diferentes clases de tamaño y diferente grado de sensibilidad a diferentes impactos ambientales (Karr 1981; Teixeira de Mello et al., 2015; Benejam et al. 2016). En peces, a nivel comunitario el efecto del impacto ambiental se manifiesta mediante la pérdida y recambio tanto de especies (Karr, 1981; Allen et al., 2006; Murry y Farrell, 2014) como de grupos tróficos (Burres et al., 2013; Hette-Tronquart et al., 2017). Dicha pérdida está asociada a la desaparición de especies sensibles, al aumento de las abundancias relativas de especies tolerantes, cambios en la composición de grupos tróficos, así como cambios en la estructura de tallas. Alteraciones en la estructura de las tramas tróficas, provocan cambios en los flujos de transferencia de materia y energía desde y hacia el ecosistema acuático (Allan, 2004; Feld, 2013; Benejam et al, 2016)

El nivel de afectación intermedio es el nivel poblacional, el cual se manifiesta a nivel somático (Wootton, 1990), en este sentido existe evidencia de efectos a nivel de órganos como el hígado, en aspectos reproductivos, reservas energéticas y de crecimiento (Binohlan y Pauly, 1998; Koutrakis y Tsikliras, 2003; Froese, 2006; Vidal et al 2018). A partir de este nivel de organización las respuestas se manifiestan a nivel de órgano cuyo efecto se observa mediante biomarcadores somáticos, los cuales se denominan señales de alarma tardía (Aito y Kallio ,1999; Hyun-Mi et al., 2006). Los biomarcadores somáticos comúnmente utilizados son el índice gonadosomático (IGS), el índice hepatosomático (IHS) y el factor de condición relativo (Kr) (Wilson et al., 2014; Ballesteros et al., 2017; Giltrap et al., 2017). El IGS, relacionado directamente con el sexo, edad y estadio reproductivo (Smith, 2004), indica el grado de desarrollo de la gónada en relación al ciclo o estado de madurez del individuo (De Vlaming et al., 1981; Sakamoto et al., 2003; Sadekarpawar y Parikh, 2013). Por otro lado, el IHS vincula posibles alteraciones hepáticas, en general relacionadas con las principales funciones de degradación de hormonas y la detoxificación de compuestos foráneos (Giltrap et al., 2017; Landa y Antolinez, 2017). Siendo el hígado responsable del proceso de desintoxicación, toda exposición a contaminantes conduce a un aumento en el tamaño del mismo por

hipertrofia y/o a un aumento en el número de hepatocitos (hiperplasia) (Solé et al. 2010; Montenegro y Gonzalez, 2012). El Kr permite evaluar la salud y la productividad de la población de los peces junto con su condición fisiológica (Richter, 2007; Rypel y Richter, 2008) a través de las relaciones de crecimiento e incremento de biomasa (Froese, 2006; Rodríguez et al., 2017).

Por último, el nivel de organización inferior, nivel de individuo, es el primer nivel de organización donde el impacto ambiental se manifiesta, mediante cambios a nivel molecular afectando la integridad de la molécula de ADN y su funcionalidad (Van der Oost et al., 2003). En este nivel, los biomarcadores consisten en cambios en la respuesta biológica la cual puede ser medida en un tejido, organismo o población evidenciando la exposición a uno o más contaminantes (Depledge y Fossi, 1994). La formación de aductos de ADN (ADN expuesto a carcinogénicos), aberraciones cromosómicas, roturas del ADN y frecuencia de formación de micronúcleos, entre otras alteraciones que pueden ocurrir a nivel del núcleo celular (Bombail et al., 2001) son biomarcadores clásicos en este nivel de organización. Estos biomarcadores genéticos de exposición y efecto tienen alta relevancia ya que reflejan el daño en el material genético a etapas tempranas de exposición (Hyun-Mi et al., 2006; Fonseca et al., 2011).

Dentro de estos biomarcadores se encuentran aquellos que evalúan lesiones en el material genético a nivel macro como el test de micronúcleos (biomarcador de efecto) y el ensayo cometa (biomarcador de exposición). Los micronúcleos (MN) son masas de cromatina intracitoplasmática separadas del núcleo, las cuales son producidas por un daño o fragmentación del ADN, directamente relacionadas con la segregación cromosómica debido a efectos de daño mutagénico (Scarpato et al., 1990; Rocha et al., 2009). La formación de MN requiere que la célula este en división y por ende presenta un metabolismo celular activo (Heddle et., 1983; Al-Sabti, 1991; Al-Sabti y Metcalfe, 1995). Por otra parte, el ensayo cometa se basa en la migración de fragmentos rotos de ADN durante la electroforesis alcalina (Lee y Stenert, 2003) detectando así daño primario en el ADN tales como rotura de doble y simple hebra, sitios álcali lábiles, daño oxidativo y “*crosslinks*”, por lo que es ampliamente utilizado para evaluar genotoxicidad en células eucariotas (Singh, 2000; Bolognesi et al., 2004). Otro biomarcador molecular a nivel individuo utilizado es el índice ARN/ADN. Comúnmente utilizado en estudios de biomonitorio como indicador del estado fisiológico y del crecimiento en peces, tanto en condiciones controladas como ensayos de laboratorio o en el campo (Clemmesen, 1988; Peck et al., 2003; Chicharo y Chicharo, 2008). Existe una fuerte relación entre el ARN y la tasa de crecimiento celular, estando esta directamente asociada a los cambios en el ambiente, por lo que la relación ARN/ADN refleja el estado metabólico del individuo en relación al ambiente (Clemmesen et al., 2003; Gilliers et al. 2006; Buckley et al., 2008; Chicharo y Chicharo, 2008; Frommel y Clemmesen, 2009).

Por lo antes mencionado el monitoreo de ambientes acuáticos mediante el análisis de señales de alarma tempranas y tardías resulta un abordaje amplio que puede permitir entender los diferentes niveles de respuesta provocados por diferentes cambios en el uso del suelo (Campoblanco Díaz y Gomero Torres, 2000). Por otra parte, comprender cuales son las características biológicas que responden en los diferentes

niveles de organización jerárquica nos permite seleccionar un conjunto adecuado de indicadores para ser incorporados en programas de biomonitoreo.

Objetivo general

Evaluar los efectos de diferentes usos del suelo sobre la calidad de agua mediante el uso de biomarcadores en diferentes niveles de organización jerárquico usando peces como bioindicadores en arroyos de Montevideo, Canelones, Maldonado y Florida.

Hipótesis

El impacto de los diferentes usos del suelo sobre los bioindicadores se evidencia a diferentes niveles de organización jerárquico. Dicho impacto está asociado a un gradiente del uso del suelo, siendo el de menor impacto los suelos asociados a actividades ganaderas y los de mayor impacto los urbanos.

Predicciones

I-A nivel comunitario la estructuración de comunidades de peces se caracteriza por la disminución de la diversidad de especies y elevada abundancia de especies tolerantes.

II-A nivel poblacional se observan efectos de disminución de la talla promedio y cambios en los principales órganos responsables de la supervivencia de los individuos (hígado y gónadas).

III- A nivel de individuo se observan daños en la molécula de ADN y cambios en la relación ARN/ADN.

Estrategia

Se trabajó dentro de un conjunto de arroyos asociados a un gradiente de impacto de acuerdo a diferentes usos del suelo determinados en base a imágenes satelitales y concentración de nutrientes en agua. El número de sistemas analizados decrece a medida que aumenta la complejidad de análisis de la información. En el conjunto de arroyos seleccionados se realizó un abordaje particular para cada nivel de organización, los diferentes arroyos se agruparon en base a un gradiente impacto de acuerdo al uso del suelo desde menos impactado asociado a ganadería extensiva hasta urbano-industrializados siendo los de mayor impacto. El análisis se llevó a cabo en tres etapas, las cuales se desarrollan en tres capítulos diferentes. Capítulo I, se analizó el impacto de los usos del suelo a nivel comunitario mediante el análisis de la estructura y composición de las comunidades de peces, considerando 27 arroyos. Capítulo II, se analizó el impacto de los usos del suelo a nivel poblacional considerando dos especies centinela de amplia distribución en los sistemas acuáticos en nuestro país, mediante el análisis de índices somáticos, para ello se trabajó con 15 arroyos. Capítulo III, se analizó el impacto de los usos del suelo a nivel, a nivel de individuos en las especies centinelas mediante el análisis de daño genético, en este caso se consideraron 8 arroyos.

Capítulo I: Análisis del efecto del uso del suelo a nivel comunitario

Introducción

Los arroyos, por su dinámica natural y la influencia de los diferentes usos del suelo, en conjunto con el ambiente circundante cambian a través del tiempo (Hynes, 1960; Hette-Tronquart et al., 2017), estos cambios generan respuestas en el ecosistema afectando la variabilidad de flujo de energía y la descarga de sedimentos en las corrientes (Allan y Castillo, 2007). Los cambios en los usos del suelo en las cuencas de drenaje afectan los ambientes acuáticos a escala global (Foley et al., 2005), tanto la urbanización como la agricultura, están asociadas a la llegada de contaminantes tanto de forma puntual como ser efluentes industriales, municipales y domiciliarios con un tratamiento deficiente, como de forma difusa (Bistoni et al., 1999; Alexandratos y Bruinsma, 2002; Chalar et al., 2013; Benejam et al., 2016; Hette-Tronquart et al., 2017; Arocena et al., 2018). Uruguay no escapa a esta realidad, donde el proceso de expansión e intensificación agrícola y crecimiento de la urbanización ejercen cambios en la calidad del agua y en las comunidades biológicas (e.g. Teixeira de Mello, 2007; Zarucki et al., 2011; Chalar et al., 2013; Benejam et al., 2016; Arocena et al., 2018).

El impacto de la agricultura sobre la calidad del agua depende de varios factores tales como el sistema de cultivo, tipo de grano y densidad, uso de fertilizantes, entre otros (Sharpley et al., 1994; Moss, 2008). Generalmente las tierras agrícolas exportan niveles más altos de nutrientes que los bosques naturales y las praderas (Ryding y Rast 1992; Jeje, 2006). Los arroyos en áreas próximas tienden a ser más eutróficos que aquellos en paisajes naturales y las comunidades que allí habitan se ven afectadas (Rodríguez-Gallego et al., 2017). Considerada como fuente no puntual de contaminación, la agricultura junto con el aumento de las áreas urbanizadas, causan efectos acumulativos a largo plazo sobre los ecosistemas acuáticos (Richards et al., 1996; Skinner et al., 1997; Alexandre et al., 2010). El transporte de sustancias contaminantes por escorrentía es una fuente de contaminación primaria en arroyos, al igual que el transporte de sedimentos, nutrientes, pesticidas y herbicidas agrícolas y varias sustancias nocivas para los organismos acuáticos (Casatti et al., 2006; Teixeira de Mello, 2007; Chalar et al., 2013; Hette-Tronquart et al., 2017; Arocena et al., 2018). La ganadería extensiva con manejo sustentable, a diferencia de la agricultura y las áreas urbanas, suele aceptarse como compatible con la conservación de la biodiversidad y los suelos (Cingolani et al., 2008; Hette-Tronquart et al., 2017).

En Uruguay, los sistemas fluviales presentan una degradación real en relación a sus parámetros de calidad de agua, la mayoría de ellos relacionados con procesos de eutrofización (Pacheco et al., 2012; Chalar et al., 2013; Bonilla et al., 2015; Arocena et al., 2018); principalmente afectados por la intensificación agropecuaria, producción lechera y *feedlots* y la baja eficiencia en plantas de tratamiento de aguas residuales (Griffero et al., 2018). También la agricultura y la forestación han tenido una gran influencia sobre la calidad

de agua en las últimas dos décadas en Uruguay (Farley et al., 2005) ya que, en dichas actividades, las praderas naturales pertenecientes a áreas prioritarias para la conservación global (Hoekstra et al., 2005) han sido reemplazadas con el fin de intensificar la producción (Rodríguez-Gallego et al., 2017). Para mantener esta intensificación, la utilización de fertilizantes se duplicó (DIEA 2018). Estos cambios en el uso del suelo puede variar de casi 0-100% de cobertura del suelo, tanto en áreas urbanas, agrícolas como forestales afectando directamente las cuencas circundantes. La deforestación de grandes superficies resulta en una degradación sustancial de hábitats afectando poblaciones de peces (Bisson et al., 1992). Los efectos del suelo están asociados al gradiente de modificación del mismo y el impacto antropogénico asociado al aumento de concentración de fósforo y nitrógeno en agua (Teixeira de Mello, 2007; Benejam et al., 2016). Esto se refleja en cambio en la estructura de tamaños de la comunidad de peces con efectos directos sobre los grupos taxonómicos que las conforman (Teixeira de Mello, 2007; Murry y Farrel, 2014; Benejam et al., 2016).

El uso de comunidades de peces para la evaluación de calidad de agua asociada al uso del suelo es una práctica común y efectiva (Justus et al., 2010; Chalar et al., 2013; Teixeira de Mello, 2014; Días et al., 2016; Valesini et al., 2017). Dado que conforman el componente vertebrado principal de la mayoría de las tramas tróficas en arroyos, muestran una gran diversidad tanto de hábitos alimenticios como de tamaño, grado de sensibilidad y respuesta a distintos niveles de impactos ambientales (Karr 1981; Di Marzio, 2000; Teixeira de Mello et al., 2015; Benejam et al., 2016). Las redes alimenticias en ecosistemas de agua dulce, incluyen herbívoros, detritívoros, omnívoros y piscívoros (Justus et al., 2010; Thompson et al., 2012; Burress et al., 2013) esta diversidad incluye el consumo de productores primarios, consumidores primarios y secundarios incluyendo otros peces y detritus (Quintans et al., 2009; Pérez-Parada et al., 2018). Las interacciones entre ellas, su rol funcional y los procesos subyacentes determinan la estructura comunitaria (Casatti et al., 2006; Murry y Farrell, 2014, Teixeira de Mello et al., 2014; Benejam et al., 2016). Dicha estructura comunitaria es utilizada como herramienta de biomonitoreo, por medio de su caracterización en base a atributos como riqueza, diversidad, presencia-ausencia de especies indicadoras, incremento en biomasa de individuos, niveles tróficos, abundancia relativa y ocurrencia de determinadas especies convierten al estudio de las comunidades de peces una herramienta para el monitoreo ambiental (Wootton, 1990; Froese, 2006; Peterson et al., 2011; Teixeira de Mello, 2007; 2012; 2014; 2015; Wilson et al., 2014; 2016). La diversidad es indicadora del funcionamiento del ecosistema (Tilman et al., 1997), dado que la riqueza de especies es sensible a las condiciones físicas de los ecosistemas, la heterogeneidad de hábitats y otros factores basados en interacciones bióticas (Ricklefs y Miller, 1999). Por su parte, la abundancia relativa de especies permite identificar aquellas especies sensibles por disminución de sus abundancias a causa de un incremento del impacto ambiental, sucediendo lo contrario en el caso de las especies tolerantes (Casatti et al., 2006; Burress et al., 2013; Chalar et al., 2013). El grado de perturbación también se puede cuantificar mediante la comparación de curvas de abundancias relativas y biomasa (Clarke y Warwick 2001). Estas curvas se basan en el supuesto de que especies pequeñas dominan en los ambientes más perturbados, mientras que las de mayor tamaño dominan en ambientes menos impactados (Yemane et al. 2005).

Objetivo general

Evaluar el impacto de diferentes usos del suelo sobre la calidad del agua y la estructura comunitaria de peces en base al análisis de la riqueza, diversidad, abundancia y biomasa.

Objetivos específicos

- Agrupar los arroyos a analizar de acuerdo a los diferentes usos del suelo.
- Clasificar las especies muestreadas según su tipo de alimentación.
- Analizar el efecto de los diferentes usos del suelo sobre las comunidades de peces mediante el análisis de abundancia relativa de especies y análisis de distribución de especies clasificadas de acuerdo al tipo de alimentación.
- Determinar el nivel de perturbación ambiental mediante la comparación de curvas de biomasa y abundancia relativa de especies según los usos del suelo.
- Analizar el efecto del suelo sobre las comunidades de peces mediante índices de diversidad.
- Analizar la agrupación de los arroyos seleccionados en base a los resultados obtenidos relación de abundancia relativa de especies, concentración de nutrientes y parámetros físico-químicos del agua.

Hipótesis

Los diferentes usos del suelo generan efectos sobre las comunidades de peces.

Predicciones

I-En arroyos afectados por la urbanización la diversidad y abundancia de especies es más baja que en arroyos asociados a actividades ganaderas.

II-Los arroyos con mayor grado de perturbación la abundancia de especies es mayor que su biomasa como resultado del aumento de la proporción de peces pequeños lo cual genera una reducción de la talla promedio comunitaria

III-Los grupos tróficos en arroyos urbanos asociados a niveles altos de impacto están dominados por especies omnívoras de pequeño tamaño, mientras que en arroyos expuestos a menores niveles de impacto los omnívoros de mediano tamaño e invertívoros serán los predominantes.

Materiales y Métodos

Área de estudio

Durante enero y febrero de 2017 se realizaron muestreos piloto exploratorios en toda el área de interés. La misma abarcó los departamentos de Montevideo, Canelones, Florida y parte de San José y Maldonado. A partir de estos muestreos, se seleccionaron los sitios aptos muestreo de agua y colecta de peces mediante pesca eléctrica. Del total de sitios relevados se seleccionó un conjunto de 27 arroyos aptos de

orden 3 y 4 (Strahler, 1964). Los mismos abarcaron zonas con diferentes tipos de usos del suelo incluyendo ganadería extensiva, ganadería y agricultura intensiva y parches de áreas urbanas (figura 1.1).

En la instancia piloto en cada sitio se colectaron muestras de agua para su posterior cuantificación de nitrógeno total (Koroleff, 1970) y fosforo total (Valderrama, 1981) en el laboratorio del Departamento de Ecología y Gestión Ambiental, Centro Universitario de la Región Este (CURE). Se registraron los parámetros físico-químicos *in situ* (temperatura del agua, salinidad, pH, oxígeno disuelto y porcentaje de saturación de oxígeno) mediante sonda multiparametro YSI 6600. A partir de esta información se caracterizaron los sitios según la calidad de agua asociada a la concentración de nutrientes y los diferentes usos del suelo.

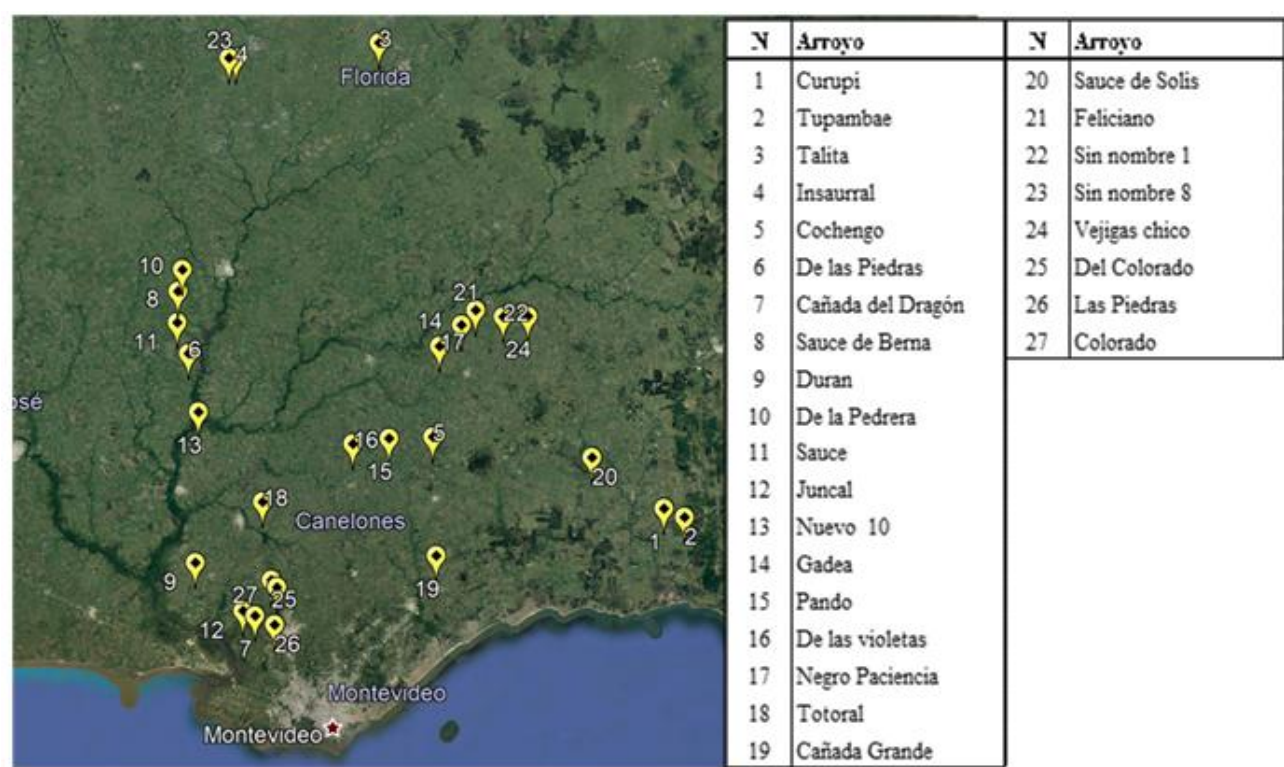


Figura 1.1. Área de estudio y ubicación de los arroyos que fueron objeto de muestreo (números 1 a 27).

Usos del suelo

A partir de datos sobre diferentes usos de suelo y resultados de nutrientes del muestreo exploratorio conjuntamente con datos satelitales disponibles de cobertura del suelo para los años 2011 y 2015 en el área de interés (figura 1.1) se realizó la clasificación, ordenamiento y agrupamiento jerárquico. Las capas correspondientes al SIT-MVOTMA (<http://sit.mvotma.gub.uy/websdatos/cobertura.html>) fueron generadas a partir de imágenes de los satélites LANDSAT, mediante la metodología Land Cover Clasification System (LCCS) de la Global Land Cover Network (GLCN) de la Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO). Esta información fue obtenida por el grupo de trabajo asociado al biomonitoreo de

arroyos (responsable Franco Teixeira de Mello) en el marco de la consultoría sobre análisis de la calidad ambiental de los recursos acuáticos de la Intendencia de Canelones (responsable Guillermo Goyenola).

Para la clasificación de arroyos, de acuerdo a los valores de cobertura del suelo por micro cuenca para cada año, se realizó un promedio para cada uso del suelo en ambos años y junto con datos promedios de nutrientes para fósforo total (PT) y nitrógeno total (NT) relevados en el muestreo piloto(enero 2017) y muestreo comunitario (febrero 2017)se agruparon y clasificaron los diferentes arroyos en 3 grandes grupos: ganadero extensivo (G), agrícolas (A) y urbano (U) (tabla1.1).

Tabla 1.1. Clasificación y agrupamiento de los distintos tipos de cobertura en los 27 arroyos seleccionados según los usos del suelo. Información satelital de cobertura disponible para los años 2011 y 2015 (LCC: Land Cover Classification System) (has: hectáreas). Información generada por Germán Taveira (LGA-CURE). (Áreas desnudas: áreas con ausencia de cobertura vegetal; (ej: roca consolidada, dunas etc), en relación a agricultura y forestación refiere a áreas de siembra o talas recientes

Usos del Suelo		LCCS_2011	LCCS_2015
G	Ganadería extensiva	Arbustos	Arbustos
		Herbáceo Natural	Herbáceo Natural
		Monte Nativo	Monte Nativo
A	Cultivo	Aguas Artificiales	Aguas Artificiales
		Áreas Desnudas	Áreas Desnudas
		Cultivos de Secano > 4-5 has	Cultivos > 4-5 ha
		Cultivos Regados > 4-5 has	Cultivos Regados y de Secano < 4-5 ha
		Cultivos Regados y de Secano < 4-5 has	Frutales
		Frutales	Plantación Forestal
		Plantación Forestal	Área Urbana
U	Urbano	Equipamiento Urbano	Áreas Urbanas Dispersas
		Canteras, Areneras, Minas a Cielo Abierto	Equipamiento Urbano
		Áreas Urbanas Dispersas	
		Área Urbana	

Muestreo de peces

La colecta de peces se realizó mediante pesca eléctrica siguiendo la metodología propuesta y ajustada para nuestro país (Teixeira de Mello et al., 2012; 2014). La misma consistió en 50 pulsos eléctricos a lo largo de 50 metros en cada arroyo (figura 1.2). Previo a la pesca se registraron los parámetros físico-químicos *in situ* en cada arroyo y se tomaron muestras de agua para su posterior análisis y cuantificación de fosforo total (PT) y nitrógeno total (NT). Todos los individuos colectados fueron sacrificados mediante sobre dosis de eugenol diluido 1:10 en alcohol y luego se fijaron en formol 10% conservándose en frascos agrupados por arroyo hasta su posterior análisis y clasificación taxonómica. Cada individuo fue identificado a nivel de especie mediante el uso de claves y bibliografía disponibles para la región (Serra et al., 2014; Loureiro et al., 2016). En el laboratorio de cada individuo se obtuvieron datos de longitud estándar (cm) y peso total (g). Luego de la pesca se obtuvieron valores del ancho en transectos cada diez metros y medidas de profundidad cada 25 cm en cada uno de los 6 transeptos.



Figura 1.2. Muestreo de peces en arroyos mediante pesca eléctrica.

Análisis de datos

De acuerdo al número de individuos por especie presentes en cada arroyo ($n=27$) se calculó la relación entre el logaritmo de la media y el logaritmo de la varianza (Taylor, 1961). Se ajustó un modelo lineal con el objetivo de encontrar la mejor transformación a los efectos de hacer más comparables los datos (Legendre y Legendre, 2012), generando una matriz de datos transformados.

Se calculó la de abundancia relativa para cada especie colectada en cada arroyo (número de individuos de la especie / número total de individuos) $\times 100$) y se graficó la distribución la abundancia relativa de acuerdo al tipo de alimentación de cada especie, los que fueron previamente determinados de acuerdo a bibliografía y datos disponibles. La clasificación de especies de acuerdo a tipo de alimentación se organizó en 7 grupos: 1) detritívoros (D) alimentándose principalmente materia orgánica del sedimento, 2) invertívoros (I) los cuales se alimentan de insectos e invertebrados, 3) omnívoros (O) con una dieta generalista, 4) piscívoros (P) los cuales se alimentan de peces, 5) herbívoros-detritívoros (H-D) alimentándose de elementos vegetales y detritos, 6) invertívoros-piscívoros (I-P) se alimentan de insectos, invertebrados y peces y 7) omnívoros-piscívoros (O-P) cuya alimentación es generalista e incluye peces.

Se calculó la biomasa de peces por especie para cada uso del suelo como la suma del peso de los individuos de cada especie.

Se determinó el nivel de perturbación ambiental en base a la comunidad mediante el análisis de curvas acumuladas de la relación abundancia-biomasa de acuerdo a los usos del suelo, a partir de datos logaritmizados ($\log_{10}+1$) (Warwick y Clarke, 1994). Para este análisis se comparó la disposición de las curvas en un mismo gráfico de abundancia y biomasa de las especies en forma de curvas tipo k -dominancia (Warwick, 1986). El modelo asume que, en condiciones de equilibrio las especies estrategias tipo k , de gran tamaño, longevas, de crecimiento lento dominan por su biomasa. A medida que en la comunidad se

incremento el grado de estrés por perturbaciones de diversa índole, se verá afectada la biomasa de estas especies, tendiendo a disminuir (Warwick, 1986). Por lo tanto en casos donde no se cumple dicho equilibrio, condiciones de perturbación ambiental, dominan en abundancia especies estrategias tipo *r* las cuales se caracterizan por ser de pequeño tamaño, rápido crecimiento y vida corta (Warwick, 1986; Clarke y Warwick, 2001; Yemane et al., 2005). Las especies se ordenaron en el eje X (en escala logarítmica) en términos de su porcentaje acumulado de abundancia y biomasa, el estadístico *W* (Warwick y Clarke, 1994) representa el área de diferencia entre las dos curvas y fue analizado en comparación a resultados obtenidos para comunidades similares.

La composición y diversidad de especies se describió mediante: 1) el índice de diversidad de Shannon-Weiner (1949) ($H' = -\sum P_i \ln P_i$), donde: P_i = proporción del número de individuos de la especie “i” con respecto al total de ejemplares (n_i/N), $\ln$ = logaritmo neperiano y se basa en la abundancia proporcional de las especies en referencia al número de especies; 2) el índice de equitatividad de Pielou (1969) ($J = H'/H_{\max}$), siendo H' el índice de Shannon-Wiener y $H_{\max} (\log_2 S)$ es la diversidad máxima que se obtendría si la distribución de las abundancias de las especies en la comunidad fuera perfectamente equitativa y el cual evalúa la proporción de diversidad de especies en relación a la diversidad máxima esperada y 3) el índice de dominancia de Berger-Parker (Magurran, 1989) ($D = N_{\max} / N$), donde $N_{\max}$ = abundancia de la especie dominante; este índice relaciona el número de individuos de la especie dominante en relación al número total de individuos de todas las especies, varía entre 0 y 1 y cuanto más se acerca a 1 significa que mayor es la dominancia y menor la diversidad.

Análisis estadístico

Para el conjunto de datos se verificaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas mediante los test de Shapiro-Wilk y Levene (Zar, 2010), respectivamente. Los datos que no los cumplieron con los supuestos se analizaron mediante métodos no paramétricos. Para todos los análisis se utilizó el programa Past versión 3.21 (Hammer, et al., 2001) y el nivel de significancia utilizado fue de $p=0,05$ para todos los casos.

La clasificación y ordenación de arroyos según los usos del suelo determinados por imágenes satelitales, se analizó mediante el análisis de componentes principales (ACP) (Davis, 1986; Harper, 1999) usando la matriz de correlaciones para verificar si existe una relación entre los usos del suelo, la concentración nitrógeno total (NT) y fósforo total (PT) y los parámetros físico-químicos relevados a campo. La variabilidad entre grupos de usos del suelo se analizó mediante el método de análisis de similitud (ANOSIM) (Clarke, 1993), con la matriz de correlaciones como algoritmo de agrupamiento.

Para verificar que no existen diferencias entre los usos del suelo de acuerdo a la abundancia de especies se utilizó un análisis de varianza (ANOVA), a partir de la matriz de datos transformados ($\log(X + 1)$). Mediante el test de permutaciones (Brower et al., 1998) se analizó si no existen diferencias entre los usos del suelo utilizando los índices de diversidad calculados.

Para verificar que no existen diferencias entre grupos de usos del suelo en base a la composición de especies, se realizó un análisis de similitud (ANOSIM) utilizando el índice de similitud de Bray-Curtis (Clarke, 1993). También, utilizando el análisis del porcentaje de similaridad (SIMPER) (Clarke, 1993) y con los datos de abundancia de especies se calculó la contribución de las especies a los grupos de usos del suelo.

La relación entre la abundancia relativa de especies, los parámetros físico-químicos relevados *in situ* y las concentración de fósforo y nitrógeno total (PT y NT) según los usos del suelo, se analizaron mediante el análisis canónico de correspondencia (CCA) (Legendre y Legendre, 2012). Para este análisis se eliminaron las especies cuya abundancia fue menor al 3%.

Resultados

La asociación de datos de cobertura del suelo según imágenes satelitales, con la agrupación definida a priori, junto con los resultados de concentración de nitrógeno y fósforo total (NT, PT) y los parámetros físico-químicos relevados en campo (Anexo 1.1), mostró la existencia de cuatro grupos. Esta organización fue estadísticamente significativa ($H_{k-w}=15,63$; $p=0,004$) y para el estadístico de Bonferroni se observaron diferencias significativas entre cada uno de ellos ($p=0,03$, $p<0,05$). En este escenario, los arroyos previamente agrupados en A (arroyos 6 al 24, tabla 1.2), fueron subdivididos en dos grupos diferentes, los cuales se denominaron A (agrícola) y AA (agrícola-ganadero). Los arroyos agrupados en A se caracterizaron por estar ubicados en áreas donde predominaron los cultivos, la conductividad promedio fue de $555\pm 252 \mu\text{Sm.cm}^{-1}$ y el porcentaje de O_2 disuelto promedio fue de $82\pm 43 \%$. Los arroyos clasificados como AA presentaron una cobertura de cultivos y ganadería extensiva, los mismos presentaron una conductividad promedio fue de $746,6 \pm 180 \mu\text{Sm.cm}^{-1}$ y el porcentaje de O_2 disuelto promedio fue de $57,3\pm 30 \%$. En cuanto a temperatura y pH en estos sitios no presentaron diferencias, en ambos casos la temperatura promedio fue de $23\pm 2,4 ^\circ\text{C}$ y $7,1\pm 0,8$ de pH.

Los arroyos agrupados en G se caracterizaron por poseer cobertura asociada a actividad de ganadería extensiva y una menor concentración de nutrientes (PT y NT) en comparación con el resto. Con valores de conductividad de $304\pm 115 \mu\text{Sm.cm}^{-1}$ mostraron la menor conductividad promedio en comparación con los demás grupos y su porcentaje de O_2 disuelto obtuvo el valor máximo $85,2 \pm 23 \%$. La temperatura promedio fue de $23,8\pm 1,7 ^\circ\text{C}$ y el pH fue de $7,8 \pm 0,4$. Por último, los arroyos agrupados en U se caracterizaron por su elevada proporción de cobertura urbana ($38,13 \pm 12$ ha) en comparación con el resto, si bien incluye actividades ganaderas ($37,42\pm 9$ ha) y agrícolas ($24,4\pm 11$ ha) en menor medida, las predominantes fueron la presencia de canteras, minas incluyendo equipamiento urbano. En promedio este grupo mostró valores máximos de nutrientes (PT y NT), la conductividad promedio fue de $690,3\pm 200 \mu\text{Sm.cm}^{-1}$ y el porcentaje de O_2 promedio fue de $53,4 \pm 6,8 \%$, el menor valor registrado de acuerdo a los 4 grupos. La temperatura promedio fue de $25\pm 1,5 ^\circ\text{C}$ y el pH fue de $7,5 \pm 0,2$. La agrupación final utilizada en el análisis comunitario fue la siguiente : en el grupo G se ubicaron 5 arroyos Curupí, Tupambaé, Talita, Insaurral y Conchengo, agrupados en A fueron 8, los arroyos De las Piedras, Cañada del Dragón, Sauce de Berna, Duran, De la

Pedreira, Sauce, Juncal y Nuevo 10, en AA fueron 11 arroyos, el arroyo Gadea, Pando, De las Violetas, Negro Paciencia, Totoral, Cañada Grande, Sauce de Solís, Feliciano, Sin nombre 1, Sin nombre 8 y Vejigas chico. En el grupo U se ubicaron 3 arroyos, la Cañada del Colorado, Las Piedras y Colorado (tabla 1.2).

En el análisis de componentes principales (ACP) las dos primeras componentes explicaron el 83,14% de la variabilidad total. La componente 1 explicó el 50,40 % de la variabilidad y se correlacionó de forma positiva con los nutrientes (PT, NT), la temperatura, la conductividad y el tipo de cobertura asociada a suelos urbanos y de manera negativa lo hizo con el pH, el % O₂ disuelto y con la cobertura asociada a uso ganadero y agrícola. La componente 2 explicó el 32,74% de la variabilidad total y se correlacionó de forma positiva con el NT, la temperatura, pH y la cobertura asociada a usos ganadero y urbano y de forma negativa lo hizo con el PT, la conductividad y la cobertura asociada a usos agrícolas del suelo (figura 1.3). Los arroyos definidos como G y U se agruparon de acuerdo a su clasificación previa y a diferencia de estos, los arroyos agrupados en A y AA mostraron un leve solapamiento. El mismo incluyó al arroyo de Las Piedras (6), la cañada del Dragón (7), Durán (9), De la Pedreira (10) y Nuevo 10 (13) agrupados en A junto con los arroyos Pando (15), de Las Violetas (16), Negro paciencia (17), Totoral (18) y Sin nombre 1 (22) agrupados en AA. El análisis de similitud entre grupos de arroyos (ANOSIM) mostró diferencias significativas ($R = 0,3476$; $p = 0,0001 < 0,05$) y se observaron diferencias significativas entre A y AA ($p = 0,041 < 0,05$) y entre AA y U ($p = 0,020 < 0,05$) (figura 1.4).

Tabla 1. 2. Clasificación final de arroyos según el uso del suelo (PT: fósforo total; NT: nitrógeno total) (G: ganadero, A: agrícola, AA: agrícola- ganadero, U: urbano).

N	Arroyo	Grupo	Promedio Usos del Suelo 2011-2015			Promedio nutrientes Enero-Febrero 2017	
			Ganaderia extensiva	Cultivos	Urbano	PT	NT
			(ha)	(ha)	(ha)	(ug/L)	(ug/L)
1	Curupí	G	92,9583	7,0417	0	21,438	521,870
2	Tupambae	G	95,5545	4,4455	0	67,098	426,578
3	Talita	G	80,7244	19,2756	0	29,793	770,028
4	Insaurral	G	69,3529	30,6471	0	65,242	706,756
5	Cochengo	G	71,8997	27,5950	0,5053	530,345	642,716
6	De las Piedras	A	8,5132	91,4868	0	3091,834	2649,375
7	Cañada del Dragón	A	25,0630	61,9149	13,0221	1345,479	2086,710
8	Sauce de Berna	A	16,7536	83,2464	0	1000,847	2010,819
9	Duran	A	21,8705	74,7859	3,3436	346,532	1095,004
10	De la Pedrera	A	28,3380	71,6620	0	315,725	1330,385
11	Sauce	A	3,1896	96,8104	0	397,420	1522,507
12	Juncal	A	11,7254	85,7921	2,4824	1001,990	1338,234
13	Nuevo 10	A	12,7362	87,2638	0	494,011	878,866
14	Gadea	AA	49,7399	50,2601	0	429,198	1203,842
15	Pando	AA	58,5802	35,7301	5,6897	794,968	1644,122
16	De las violetas	AA	56,8821	43,1179	0	688,036	1223,085
17	Negro Paciencia	AA	55,4256	44,2021	0,3723	229,560	618,700
18	Totoral	AA	43,2025	56,7975	0	610,183	834,838
19	Cañada Grande	AA	63,9961	31,3935	4,6104	165,375	1010,950
20	Sauce de Solís	AA	60,2062	39,7938	0	33,506	1170,283
21	Feliciano	AA	62,7138	37,2862	0	284,375	843,612
22	Sin nombre 1	AA	54,8220	45,1780	0	283,404	902,881
23	Sin nombre 8	AA	75,5265	24,4735	0	99,633	907,653
24	Vejigas chico	AA	63,0819	36,9181	0	206,351	890,874
25	Del Colorado	U	46,4949	25,7424	27,7627	1447,598	2979,279
26	Las Piedras	U	29,1737	35,0971	35,7292	1310,959	5702,708
27	Colorado	U	36,6038	12,4973	50,8989	1701,037	6017,215

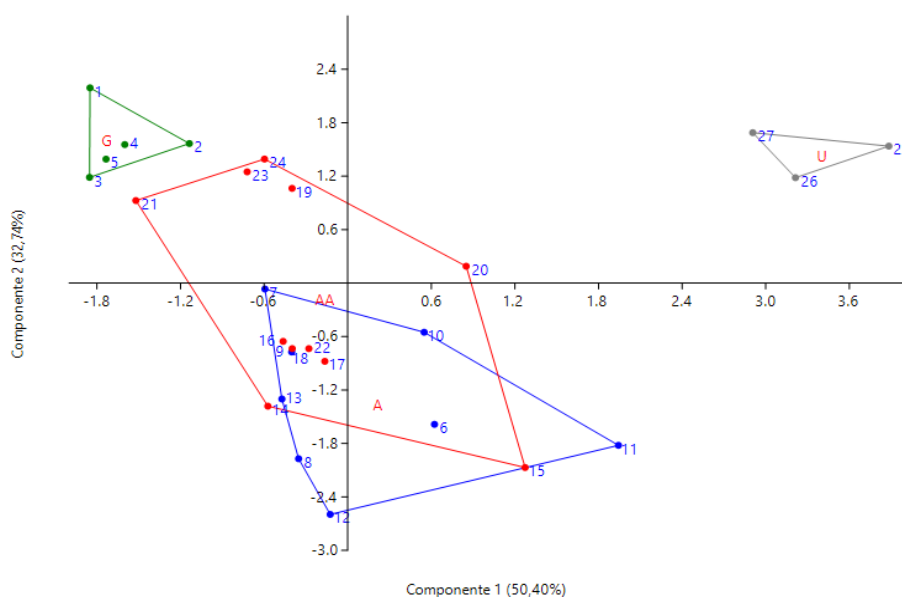


Figura 1.3. Resultado del análisis de componentes principales (ACP) de los arroyos muestreados según clasificación por usos del suelo (verde: ganadero G; azul: agrícola A; rojo: agrícola-ganadero AA; gris: urbano U) (Números del 1al 27 corresponden a los arroyos, ver tabla1.2).

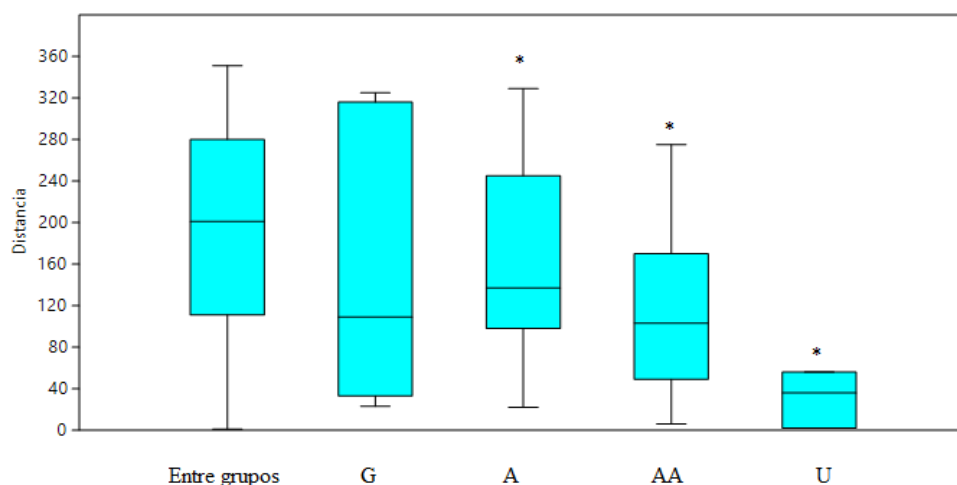


Figura 1.4. Biplot del análisis de similitud (ANOSIM) entre y dentro de grupo de usos del suelo de acuerdo al tipo de cobertura, datos físico-químicos y nutrientes. (G: ganadero; A: agrícola, AA: agrícola-ganadero, U: urbano) *valores significativos $p < 0,05$

En los 27 arroyos muestreados se colectaron un total de 33791 individuos pertenecientes a 37 especies diferentes. Las especies con mayor número de individuos (ind) en el total de individuos muestreados, fueron *Cnesterodon decemmaculatus* (Cde) (26444 ind), *Characidium rachovii* (Cra) (1606 ind), *Gymnogeophagus terrapurpure* (Gter) (894 ind), *Bryconamericus iheringii* (Bh) (854 ind), *Hyphessobrycon meridionalis* (Hme) (744 ind) y *Cheirodon interruptus* (Cin) (710 ind) las cuales estuvieron presentes en más de la mitad de los arroyos muestreados particularmente Cde estuvo presente en todos los arroyos. Las especies con menor representatividad fueron, *Diapoma terofali* (Dte) (6 ind), *Gymnotus omarorum* (Gom) (3 ind), *Ancistrus taunayi* (Ata) (3 ind), *Hyphessobrycon luetkeni* (Hlu) (1 ind) y *Astyanax rutilus* (Aru) (1ind) (tabla 1.3).

En el total de arroyos muestreados las especies omnívoras (O) fueron las más abundantes con el 92,10% de la abundancia relativa total, seguida por las invertívoras (I) con el 5,54 %, las especies invertívoras-piscívoras (I-P) con el 0,71% y los omnívoras-piscívoras (O-P) con el 0,69%. Los grupos con menor abundancia relativa fueron las especies detritívoras (D) con el 0,46 %, seguidas por las herbívoras-detritívoras (H-D) con el 0,43 % y las especies menos abundantes fueron las piscívoras (P) con el 0,04% de la abundancia relativa total (figura 1.5).

Tabla 1.3. Lista de especies colectadas en los 27 arroyos muestreados. N total: número de individuos colectados en el total de sitios. (Clasificación de tipos de alimentación: H-D: herbívora-detritívora; D: detritívora O: omnívora; O-P, omnívora-piscívora I: invertívora; I-P: invertívora-piscívora; P: Piscívora).

Especie	Sigla	N total	Alimentacion	Clasificación	Fuente
<i>Ancistrus taunayi</i>	Ata	3	Algas adheridas al substrato y detrito	H-D	Burress et al., 2013; Teixeira de Mello et al., 2011
<i>Astyanax sp.</i>	Asp	228	Omnívora	O	Serra et al., 2014
<i>Astyanax rutilus</i>	Aru	1	Omnívora	O	Serra et al., 2014
<i>Australoheros facetus</i>	Afa	214	Omnívora	O	Yafe et al., 2002
<i>Australoheros scitulus</i>	Asc	26	Omnívora	O	Burress et al., 2013
<i>Bryconamericus iheringii</i>	Bh	854	Omnívora	O	Teixeira de Mello et al., 2011; Lambert et al., 2004
<i>Characidium rachovii</i>	Cra	1606	Insectos e invertebrados	I	Teixeira de Mello datos no publicados
<i>Charax stenopterus</i>	Cst	75	Insectos e invertebrados	I	Teixeira de Mello datos no publicados
<i>Cheirodon interruptus</i>	Cin	710	Omnívora	O	Serra et al., 2014
<i>Cnesterodon decemmaculatus</i>	Cde	26444	Omnívora	O	Serra et al., 2014; Quintans et al., 2009
<i>Corydoras paleatus</i>	Cpa	88	Omnívora	O	Malabarba et al., 2013
<i>Crenicichla scottii</i>	Csc	56	Invertebrados , insectos y peces	I-P	Burress et al., 2013
<i>Cyphocharax voga</i>	Cvo	50	Materia orgánica del sedimento	D	Serra et al., 2014; Malabarba et al., 2013
<i>Diapoma terofali</i>	Dte	6	Omnívora	O	Serra et al., 2014
<i>Ectrepopterus uruguayensis</i>	Eur	461	Omnívora	O	Malabrba et al., 2013
<i>Gymnogeophagus mekinos</i>	Gme	171	Omnívora	O	Burress et al., 2013
<i>Gymnogeophagus terrapurpur</i>	Gter	894	Omnívora	O	Yaffe et al., 2002; Burress et al., 2013; Loureiro et al., 2016
<i>Gymnotus omarorum</i>	Gom	3	Invertebrados , insectos y peces	I-P	Serra et al., 2014
<i>Heptapterus mustelinus</i>	Hmu	128	Omnívora y peces pequeños	O-P	Serra et al., 2014
<i>Hisonotus charrua</i>	Hch	14	Algas adheridas al substrato y detrito	H-D	Serra et al., 2014
<i>Hisonotus nigricauda</i>	Hni	9	Algas adheridas al substrato y detrito	H-D	Serra et al., 2014
<i>Hoplias aff. malabaricus</i>	Hma	83	Omnívora y peces pequeños	O-P	Teixeira de Mello et al., 2006
<i>Hyphessobrycon anisitsi</i>	Han	5	Omnívora	O	de Oliveira y Bennemann, 2005
<i>Hyphessobrycon meridionalis</i>	Hme	844	Omnívora	O	Soneira et al., 2006
<i>Hyphessobrycon luetkeni</i>	Hlu	1	Omnívora	O	Soneira et al., 2006
<i>Hyphessobrycon togoi</i>	Hto	9	Omnívora	O	Malabrba et al., 2013
<i>Hypostomus commersonii</i>	Hyco	16	Obtiene su alimento raspando algas y detrito del fondo	H-D	Malabrba et al., 2013
<i>Jenynsia lineata</i>	Jli	91	Omnívora	O	Quintans et al., 2009
<i>Oligosarcus jenynsii</i>	Oje	179	Invertebrados , insectos y peces	I-P	Hartz et al., 1996
<i>Otocinclus arnoldi</i>	Oar	32	Algas y detrito que raspa de superficies	H-D	Malabrba et al., 2013
<i>Phalloceros caudimaculatus</i>	Pca	61	Omnívora	O	Casatti, 2002; Serra et al., 2014
<i>Pimelodella australis</i>	Pau	38	Omnívora	O	Serra et al., 2014
<i>Pseudocorinopoma doriae</i>	Pdo	186	Insectos e invertebrados	I	Serra et al., 2014
<i>Rhamdia aff. quelen</i>	Rqu	17	Omnívora y peces	O-P	Serra et al., 2014; Burress et al., 2013
<i>Rineloricaria sp.</i>	Rlo	67	Algas adheridas al substrato y detrito	H-D	Burress et al., 2013
<i>Steindachnerina biornata</i>	Sbi	105	Materia orgánica del sedimento	D	Serra et al., 2014; Burress et al., 2013
<i>Synbranchus marmoratus</i>	Sma	17	Peces	P	Malabarba et al., 2013

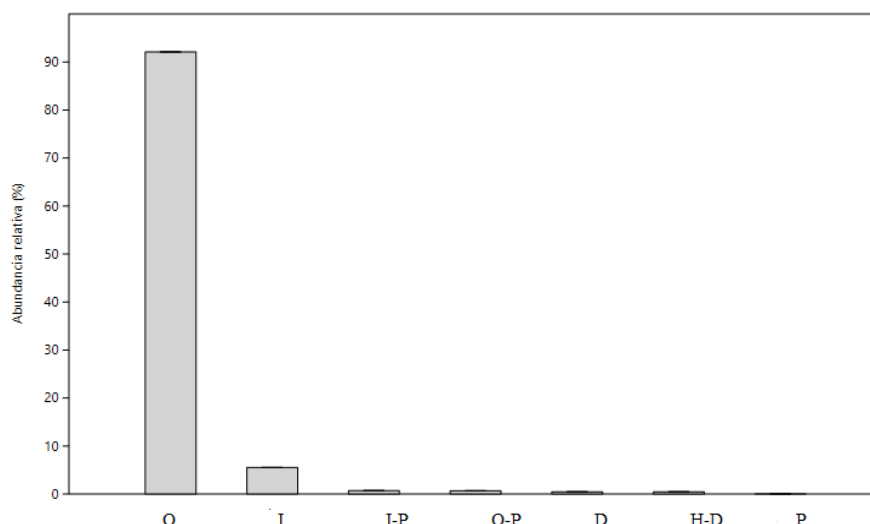


Figura1 5. Distribución de la abundancia relativa (%) de especies según clasificación de acuerdo al tipo de alimentación (O: omnívora; I: invertívora; I-P: invertívora-piscívora; O-P, omnívora-piscívora; D: detritívora; H-D: herbívora-detritívora P: Piscívora)

De acuerdo a los usos del suelo, cada grupo de arroyos se caracterizó de la siguiente manera:

-En los arroyos ganaderos (G) del total de especies muestreadas se colectaron 2433 individuos pertenecientes a 27 especies diferentes obteniendo una biomasa total de 3297 g. Las especies con mayor abundancia relativa representaron el 75,57 %, ellas fueron *C. decemmaculatus* (Cde) con el 64,40 %, *B. iheringii* (Bh) 7,27 % y *G. terrapurplea* (Gter) 3,9%. (tabla 1.4). Las especies con mayor biomasa fueron Gter con el 15,72 %, *Astyanax* sp. (Asp) con 14,88 % y *A. facetus* (Afa) con el 12,623 % de la biomasa total. Por su parte *A. scitulus* (Asc), *H. charrua* (Hch) y *H. nigricauda* (Hni) significaron menos del 1% de la biomasa total (tabla 1.4). En estos arroyos las especies omnívoras (O) fueron las más abundantes representando el 89,85 % y las menos abundantes fueron las detritívoros (D) con el 0,123 % de la abundancia relativa total en el conjunto de arroyos (tabla 1.5).

-En los arroyos agrícolas (A) se colectaron 9527 individuos pertenecientes a 30 especies, cuya biomasa total fue de 5443 g. Las especies con mayor abundancia relativa sumaron el 83,6 %, la misma se distribuyó entre Cde con el 73,83 %, Bh con 5,090 % y Gter con 4,68%. (tabla1.4). Las especies con mayor biomasa fueron Gter con 17,13 % y Afa con 12,113 % de la biomasa total de peces colectados, por su parte Hch, Hni, Hco, *Hypostomus commersonii* (Hyco) y *Jenynsia lineata* (Jli) representaron menos del 1% de la biomasa total en este grupo de arroyos (tabla1.4). La especies omnívoras (O) fueron las más abundantes, representaron el 93,67 % y las menos abundantes fueron las piscívoras (P) con el 0,042 % de la abundancia relativa total para el grupo de arroyos (tabla 1.5).

-En los arroyos agrícolas-ganaderos (AA) se colectaron 19659 individuos, los cuales se agruparon en 35 especies y sumaron 9348 g de biomasa total. La especie más abundante fue Cde representando el 80,02 % de abundancia relativa total (tabla 1.4). En cuanto a la biomasa *H.aff. malabaricus* (Hma) con el 14,87% y Gter con el 11,49 % fueron las especies con mayor biomasa, por su parte Hto, Han, Dte, Hlu, Hyco, Hni, Ata, Rlo

y Aru representaron cada una menos del 1% de la biomasa total (tabla1.4). Las especies omnívoras (O) representaron el 91 % de la abundancia relativa total, siendo las piscívoras (P) con el 0,03 % las menos abundantes en el conjunto de arroyos (tabla1.5).

-En los arroyos urbanos (U) se colectaron 2172 individuos pertenecientes a 14 especies diferentes, la biomasa total fue de 355g. La especie más abundante fue Cde con el 97,23 % de la abundancia relativa total (tabla 1.4). La especie con mayor porcentaje de biomasa fue Cde con el 52,16 %, las especies con biomasa menor al 1% fueron Oar, *S. biornata* (Sbi), Cra y Hmu (figura 1.4). En los arroyos aquí agrupados las especies omnívoras (O) representaron el 98 % de la abundancia relativa total, siendo las invertívoras-piscívoras (I-P) las de menor abundancia con el 0,09 % y las piscívoras (P) estuvieron ausentes (tabla 1.5).

De acuerdo a los resultados de la relación entre el log de la media y el log de la varianza (Ley de Taylor, 1961) ($\text{Log varianza} = 1,0193 \log \text{media} + 0,4643$; $r^2 = 0,9543$), la transformación raíz cuadrada fue la más adecuada para el análisis del número de individuos por especie.

El análisis de varianza de la abundancia relativa de especies entre los usos de suelo no mostró diferencias significativas ($F=0,7023$; $p=0,5521>0,05$). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre la abundancia relativa de especies según el tipo de alimentación de acuerdo a los usos del suelo ($H_{k-w}=6,243$; $p=0,1004>0,05$). Las curvas de la abundancia y biomasa acumulada para cada uso del suelo mostraron la abundancia por encima de la de biomasa para todos los casos (figura 1.6). En los arroyos G las curvas fueron más cercanas en comparación con el resto de los sitios. En los arroyos agrupados en G, *G. terrapurpura* (Gter), *Astyanax* sp. (Asp) y Bh fueron las especies de mayor porcentaje biomasa, para A lo hicieron Gter y *A. facetus* (Afa). En los arroyos agrupados en AA las especies de mayor porcentaje de biomasa fueron Gter y Hma y en los arroyos U la única especie fue Cde.

Tabla 1. 4. Abundancia relativa (%) y Biomasa (%) de especies según los usos del suelo (G: ganadero; A: agrícola; AA: agrícola-ganadero; U: urbano).

% Abun relativa					% Biomasa				
Especie	G	A	AA	U	Especie	G	A	AA	U
Ata	0,082	0	0,005	0	Ata	0,983	0	0,004	0
Asp	2,877	0,913	0,310	0,460	Asp	14,888	5,510	2,268	5,835
Aru	0	0	0,005	0	Aru	0	0	0,002	0
Afa	3,124	0,399	0,508	0	Afa	12,623	12,113	5,936	0
Asc	0,082	0	0,122	0	Asc	0,085	0	2,754	0
Bh	7,275	5,091	0,972	0,046	Bh	9,696	9,653	2,895	1,635
Cra	3,288	2,823	6,379	0,138	Cra	1,825	1,639	4,708	0,113
Cst	0,534	0,105	0,265	0	Cst	0,870	0,428	0,849	0
Cin	3,658	4,209	1,089	0,276	Cin	2,965	8,933	2,485	3,377
Cde	64,406	73,820	80,025	97,238	Cde	4,156	10,349	10,712	52,159
Cpa	0,452	0,357	0,168	0,460	Cpa	1,080	1,086	0,818	11,585
Csc	1,356	0,073	0,081	0	Csc	3,888	3,318	2,067	0
Cvo	0	0,168	0,173	0	Cvo	0	3,612	9,400	0
Dte	0	0	0,031	0	Dte	0	0	0,025	0
Eur	1,439	0,693	1,831	0	Eur	1,110	0,810	2,476	0
Gme	1,767	1,254	0,041	0	Gme	5,708	5,061	0,425	0
Gter	3,905	4,681	1,791	0,046	Gter	15,719	17,135	11,494	4,595
Gom	0,082	0	0,005	0	Gom	0,813	0	0,567	0
Hmu	2,836	0,199	0,198	0,046	Hmu	8,228	0,838	1,768	0,056
Hch	0,041	0,136	0	0	Hch	0,070	0,055	0	0
Hni	0,082	0,052	0,010	0	Hni	0,049	0,048	0,007	0
Hma	0,288	0,273	0,254	0	Hma	2,393	6,048	14,877	0
Han	0	0	0,025	0	Han	0	0	0,042	0
Hme	0,740	1,511	3,469	0	Hme	0,816	1,622	4,304	0
Hlu	0	0	0,005	0	Hlu	0	0	0,025	0
Hto	0,123	0	0,031	0	Hto	0,403	0	0,061	0
Hyco	0,082	0,126	0,010	0	Hyco	2,887	0,066	0,009	0
Jli	0	0,010	0,402	0,506	Jli	0	0,013	0,615	1,066
Oje	0,206	0,744	0,524	0	Oje	2,390	5,655	6,411	0
Oar	0	0,220	0,051	0,046	Oar	0	0,524	0,147	0,564
Pca	0	0,640	0	0	Pca	0	0,170	0	0
Pau	0	0,094	0,148	0	Pau	0	0,656	1,356	0
Pdo	0,247	0,483	0,682	0	Pdo	0,224	1,045	2,699	0
Rqu	0	0,105	0,020	0,138	Rqu	0	0,371	0,377	8,569
Rlo	0,740	0,399	0,010	0,414	Rlo	0,743	0,327	0,004	5,232
Sbi	0,123	0,378	0,331	0,046	Sbi	1,477	2,235	5,116	0,226
Sma	0,164	0,042	0,031	0,138	Sma	3,912	0,682	2,299	4,989

Tabla 1.5. Abundancia relativa (%) de especies según tipo de alimentación de acuerdo a los usos del suelo (G: ganadero; A: agrícola; AA: agrícola-ganadero; U: urbano). (H-D: herbívora-detritívora; D: detritívora O: omnívora; O-P, omnívora-piscívora I: invertívora; I-P: invertívora-piscívora; P: Piscívora).

Uso del suelo	D	H-D	I	I-P	O	O-P	P
G	0,12	1,03	4,07	1,64	90	3,12	0,16
A	0,55	0,93	3,41	0,82	93,67	0,58	0,04
AA	0,50	0,09	7,32	0,61	91,0	0,47	0,03
U	0,14	1,01	0,41	0,09	98	0,41	0,14

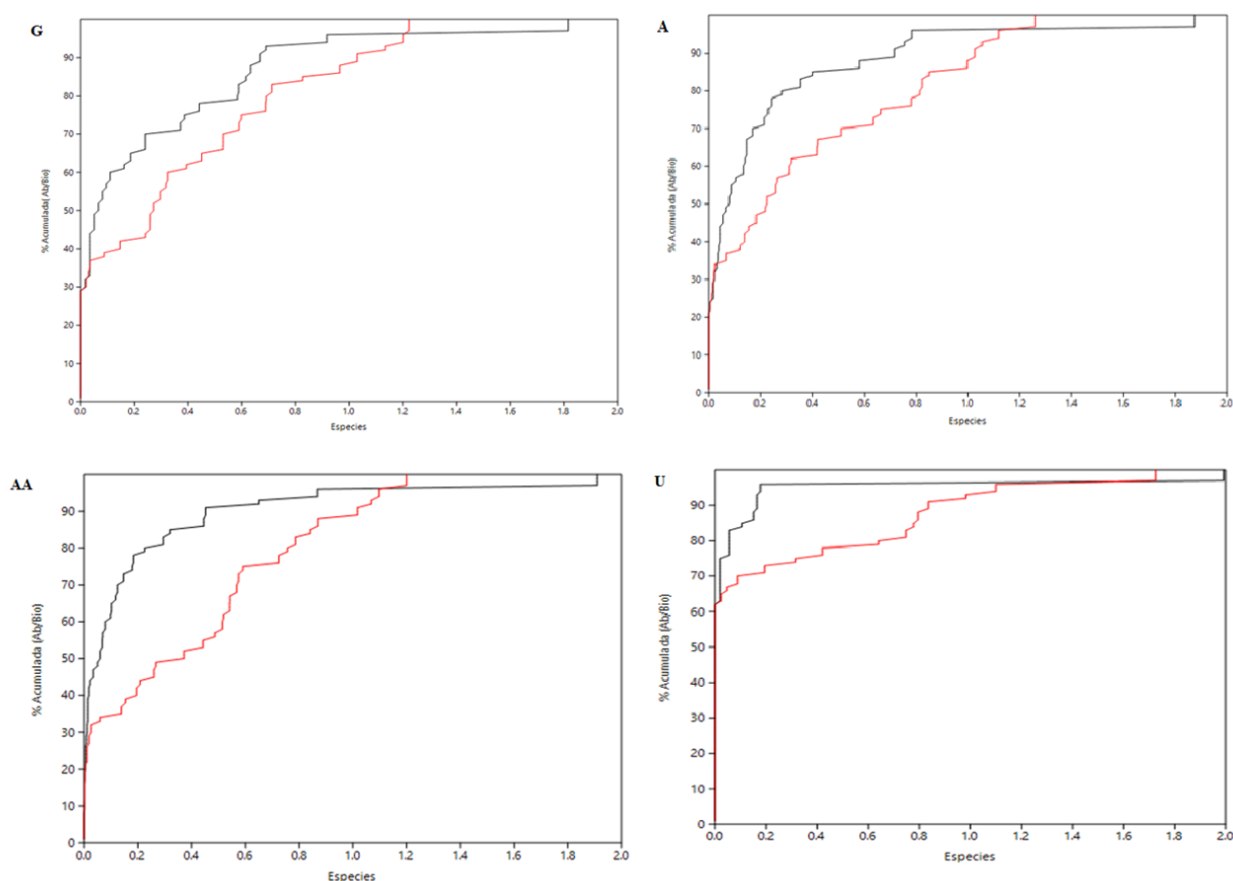


Figura 1.6. Curvas acumuladas de abundancia relativa (%) (Ab) y Biomasa (%) (Bio) para las diferentes especies de acuerdo a los usos del suelo (G: ganadero; A: agrícola; AA: agrícola-ganadero; U: urbano) (abundancia: negro; biomasa: rojo).

La diversidad de especies se caracterizó por un marcado gradiente asociado a los diferentes niveles de impacto según los usos del suelo (figura 1.7). El índice de Shannon-Wiener (H') mostro que los arroyos agrupados en G tienen una mayor diversidad de especies ($H'_G = 1,565$) en comparación con el resto , siguiéndole en diversidad los arroyos agrupados en A ($H'_A = 1,192$) y los agrupados en AA ($H'_{AA} = 0,8656$), por último los arroyos agrupados en U fueron los de menor diversidad de especies ($H'_U = 0,1875$). Por su parte la equitatividad de especies reflejado por el índice de Pielou mostró el mismo comportamiento, siendo los arroyos agrupados en G los de mayor equitatividad ($J_G = 0,4748$) seguido por los agrupados en A ($J_A = 0,3505$) y AA ($J_{AA} = 0,2435$). Los arroyos agrupados en U mostraron valores cercanos a cero para el índice ($J_U = 0,07106$) siendo éstos los de menor equitatividad en comparación al resto. A diferencia de los

anteriores el índice de Berger-Parker mostró comportamiento opuesto. La mayor dominancia de especies en los arroyos agrupados en U ($B_U = 0,9724$) seguido por los agrupados en AA ($B_{AA} = 0,837$) y A ($B_A = 0,7516$). Por su parte los arroyos agrupados en G mostraron la menor dominancia de especies ($B_G = 0,6441$).

El test de permutaciones para los tres índices de acuerdo a los usos del suelo mostró diferencias significativas ($p = 0,0001 < 0,05$) entre todos ellos para cada uso del suelo.

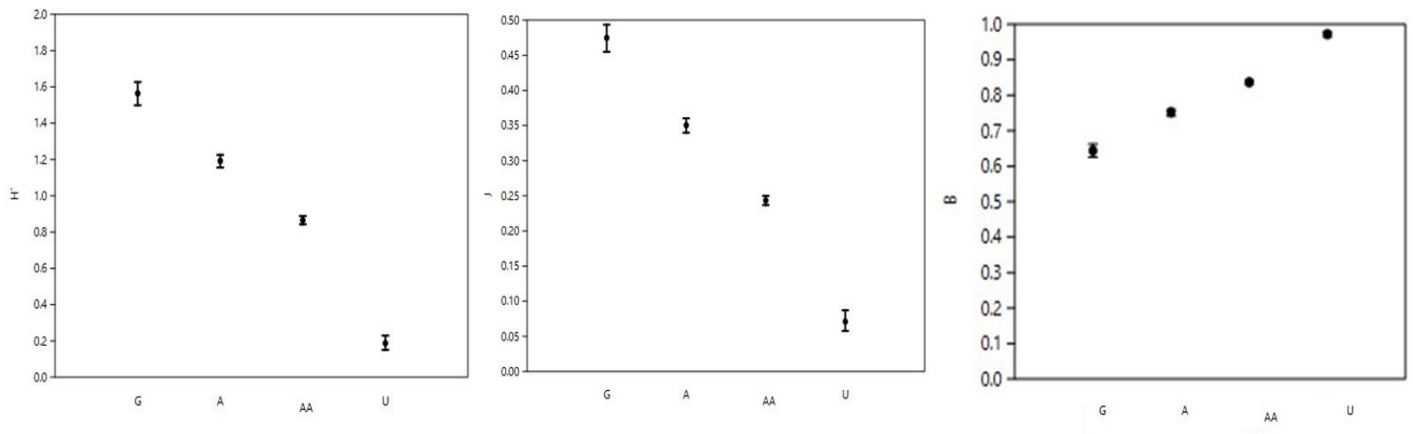


Figura 1.7. Índices de diversidad (H' : Shannon-Wiener; J : Pielou; B : Berger-Parker) para cada uso del suelo (G: ganadero; A: agrícola; AA: agrícola-ganadero; U: urbano).

El análisis de similaridad (ANOSIM) entre los usos del suelo fue significativo ($R = 0,177$, $p = 0,0246 < 0,05$) y se encontraron diferencias significativas entre G-AA ($p = 0,0258 < 0,05$), G-U ($p = 0,0102 < 0,05$), A-U ($p = 0,0006 < 0,05$) y entre AA-U ($p = 0,0006 < 0,05$). Las diferencias entre usos del suelo observadas estuvieron determinadas principalmente por 5 especies, que representaron un 49,5% del porcentaje acumulado: Cde contribuyó un 27,02%, seguida por Bh con 7,046 %, Gter con 5,548 %, Cra con 5,184 % y Cin contribuyó con el 4,707 % (tabla 1.6). De acuerdo a la abundancia relativa de especies, G, estuvo determinado principalmente por Cde (11,6), Bh (4,49) y Gter (4,2), A estuvo igualmente determinado por Cde (16,9), Bh (6,29) y Gter (5,88). Por su parte los arroyos agrupados en AA estuvieron determinados por Cde (27,6), Cra (6,14) y Gter (5,19) en el caso de los arroyos agrupados en U Cde (19,9) fue la única especie determinante desde el punto de vista de la abundancia relativa de especies.

Tabla 1.6. Resultados del análisis de porcentaje de similitud (SIMPER) entre usos del suelo y contribución de la abundancia de cada especie a cada grupo (media 1 = G; media 2 = A; media 3 = AA y media 4 = U).

Espece	Contribución (%)	Cumulative (%)	Abundancia media 1 (G)	Abundancia media 2(A)	Abundancia media 3(AA)	Abundancia media 4 (U)
Cde	27.02	27.02	11.6	16.9	27.6	19.9
Bh	7.046	34.06	4.49	6.29	2.87	0.333
Gter	5.518	39.58	4.2	5.88	5.19	0.333
Cra	5.184	44.77	3.85	3.19	6.14	0.577
Cin	4.707	49.47	3.46	4.79	4.11	0.816
Hme	4.353	53.83	1.89	3.47	4.98	0
Eur	4.045	57.87	1.51	1.75	3.98	0
Afa	3.128	61	3.16	1.57	2.08	0
Asp	3.089	64.09	3.2	3.13	1.75	1.05
Hmu	2.802	66.89	3.2	0.946	1.5	0.333
Gte	2.658	69.55	2.15	2.03	0.397	0
Oje	2.565	72.11	0.766	2.02	2.35	0
Pdo	2.533	74.65	0.49	1.87	2.01	0
Cst	2.107	76.75	1.18	0.632	1.71	0
Rlo	2.084	78.84	1.6	1.07	0.2	1
Cpa	1.993	80.83	0.912	1.52	1.11	1.82
Sbi	1.96	82.79	0.346	1.24	1.49	0.333
Jli	1.912	84.7	0	0.125	0.889	1.67
Csc	1.877	86.58	2.2	0.467	0.853	0
Hma	1.81	88.39	0.69	1.45	1.45	0
Cvo	1.238	89.63	0	0.933	0.981	0
Rqu	1.144	90.77	0	0.758	0.2	0.805
Pca	1.131	91.9	0	1.23	0	0
Pau	1.072	92.97	0	0.633	0.841	0
Oar	1.023	94	0	0.889	0.316	0.333
Sma	1.003	95	0.546	0.427	0.541	0.577
Asc	0.9029	95.9	0.4	0	0.899	0
Hni	0.6407	97.25	0.4	0.393	0.2	0
Hto	0.525	97.78	0.346	0	0.245	0
Hch	0.5172	98.3	0.2	0.451	0	0
Hco	0.356	98.65	0	0.25	0.141	0
Dte	0.3263	98.98	0	0	0.341	0
Ata	0.2952	99.27	0.283	0	0.1	0
Gom	0.2932	99.57	0.4	0	0.1	0
Han	0.2813	99.85	0	0	0.315	0
Hlu	0.08081	99.93	0	0	0.1	0
Aru	0.072	100	0	0	0.1	0

Los 2 primeros factores del análisis canónico de correspondencia (CCA) explicaron el 72,69 % de la variabilidad total. La especies eliminadas para el análisis fueron Ata, Aru, Dte, Gom, Hch, Han , Hlu, Hto y Pca (ver siglas tabla 1.3). El eje 1 explicó el 42,98 % de la variabilidad total y no fue significativo (valor propio = 0,101, test de permutaciones, $p=0,258>0,05$). Las variables ambientales que aportaron de manera positiva fue el pH y de manera negativa lo hizo el nitrógeno total. En cuanto a las especies aportaron de manera positiva Afa, Asc, Cde, Cra, Cst, Cvo, Eur, Gme, Gter, Hma, Hme, Oje y Sbi y Asp, Bh, Cin, Cpa, Csc, Hmu, Hni, Hyco, Jli, Oar, Pau, Pdo, Rlo, Rqu y Sma lo hicieron de manera negativa. El eje 2 explicó el 29,71 % de la variabilidad total y fue levemente significativo (valor propio = 0,070, test de permutaciones, $p= 0,042<0,05$). Las variables ambientales que aportaron positivamente fueron el fósforo total junto con la

conductividad y de manera negativa el oxígeno disuelto. Las especies que aportaron positivamente fueron Cde, Cpa, Cst, Cvo, Hme, Jli, Oar, Pau, Pdo y Rqu, por su parte Afa, Asc, Asp, Bh, Cin, Cra, Csc, Eur, Gme, Gter, Hma, Hmu, Hni, Hyco, Oje, Rlo, Sbi y Sma lo hicieron de forma negativa (figura 1.9). Este análisis mostró una importante superposición relacionada a los usos del suelo ganadero (G), agrícola (A) y agrícola ganadero (AA), aunque varios de los arroyos agrupados en los usos agrícola (A) y agrícola ganadero (AA), se separan de manera considerable. Por otra parte el uso urbano se separa claramente del resto, influenciado principalmente por los aportes de fósforo (PT) y nitrógeno total (NT) y que se diferencian claramente de aquellos arroyos que tiene valores altos de conductividad (Cond), pH y oxígeno disuelto (O2 dis). También es de destacar las especies que hacia la derecha se asocian a estas condiciones, de aquellas especies que habitan arroyos con mayores contenidos de nitrógeno y fósforo total (figura 1.8).

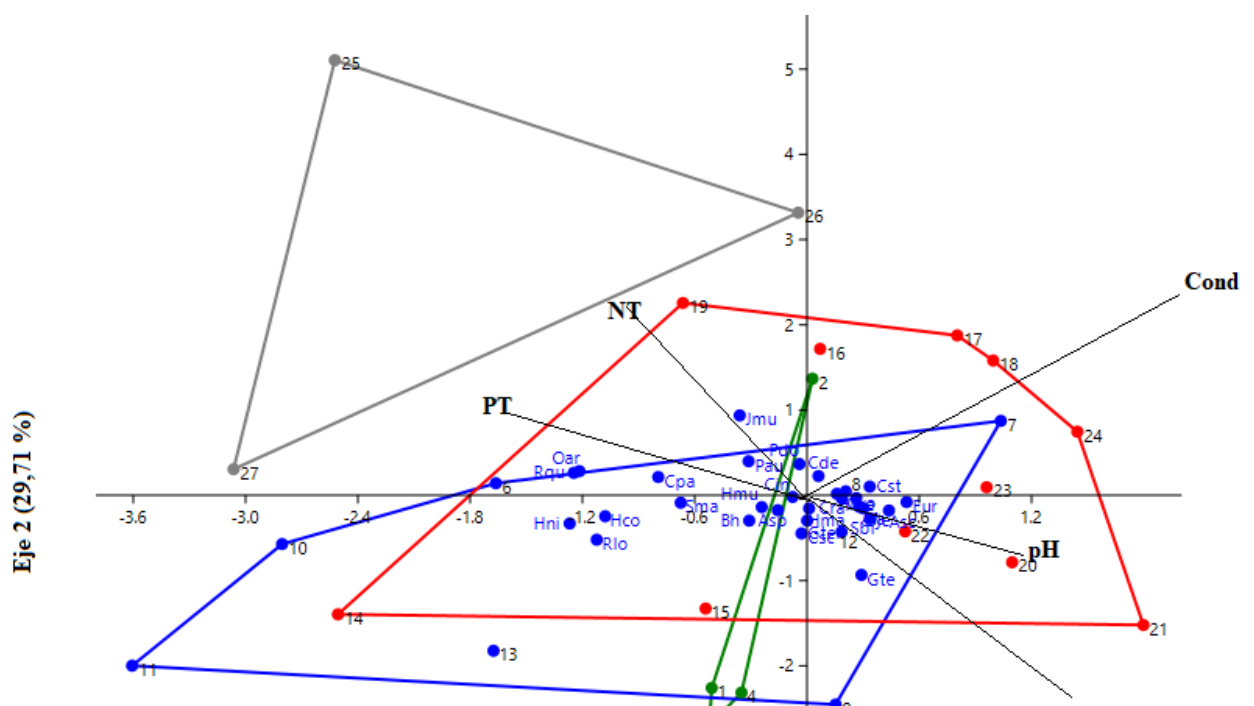


Figura 1.8. Análisis canónico de correspondencia (CCA) entre las variables ambientales (NT: nitrógeno total, PT: fósforo total; ph; Cond: conductividad; O2 dis: oxígeno disuelto) y la abundancia de especies en arroyos (números del 1 al 27) de acuerdo a los usos del suelo (G:verde; A:azul; AA: rojo; U: gris) (A. taunayi (Ata), Astyanax sp.(Asp), A. rutilus(Aru), A. facetus (Afa), A. scitulus (Asc), B. iheringii(Bh), C. rachovii (Cra), C. stenopterus (Cst), C. interruptus (Cin), C. decemmaculatus (Cde), C. paleatus(Cpa), C. scottii(Csc), C. voga(Cvo), D. terofali(Dte), E. uruguayensis(Eur), G. mekinos(Gme), G. terrapurple(Gter), G. omarorum(Gom), H. mustelinus(Hmu), H. commersonii(Hco), H. charrua(Hch), H. nigricauda(Hni), H. aff. malabaricus(Hma), H. anisitsi(Han), H. meridionalis(Hme), H. luetkeni(Hlu), H. togoi(Hto), H. commersonii(Hyco), J. lineata(Jli), O. jenynsii (Oje), O. s. arnoldi(Oar), P. caudimaculatus(Pca), P. australis(Pau), P. doriae(Pdo), R. aff. quelen(Rqu), Rineloricaria . sp(Rlo), S. biornata(Sbi), S. marmoratus(Sma). Números del 1 al 27 corresponden a los arroyos, ver tabla 1.2.

Discusión

La agrupación de los arroyos según la cobertura del suelo basado únicamente en imágenes satelitales no fue suficiente para la clasificación final de los arroyos ya que al realizar la evaluación conjunta con datos de concentración de nutrientes y parámetros físico-químicos del agua mostró la existencia de un cuarto grupo dentro del conjunto. El ANOSIM mostró que los 27 arroyos muestreados se organizaron en 4 grupos de usos del suelo: ganadero (G), agrícola (AA), agrícola-ganadero (AA) y urbano (U). Para esto los dos tipos de usos del suelo A y AA, que incluyen a G, algunos arroyos mostraron solapamiento en el análisis de componentes principales (basado en la cobertura y los nutrientes) y en el análisis canónico de correspondencias, que solo tuvo en cuenta los parámetros físico-químicos, los nutrientes y las especies colectadas en los arroyos. Ambos métodos se basan en procedimientos y en espacios de distancias diferentes, a pesar de brindar un patrón de ordenación y superposición similar. Esto estaría asociado a que los datos de cobertura y uso del suelo obtenidos a partir de imágenes satelitales conjuntamente con resultados de la concentración promedio de nutrientes (PT y NT), los 10 arroyos involucrados se incluyen áreas asociadas a cultivos y áreas asociadas a ganadería, los cuales mostraron elevadas concentraciones de nutrientes. Por ejemplo, en el caso de los arroyos pertenecientes al grupo A (arroyos 6, 7, 9, 10 y 13) el área cultivada es mucho mayor que la ganadera, por eso en su clasificación, se observaron concentración de nutrientes similares y cierto grado de superposición. En este sentido, la falta de criterios bien definidos para categorizar el uso del suelo a partir de imágenes satelitales y la inclusión de variables obtenidas in situ, pudo haber generado el grado de solapamiento mostrado por ambos métodos, aunque la contribución de las especies relacionadas a ambientes con mayores valores de conductividad, pH y oxígeno, en relación a aquellos ambientes más degradados, mostrado por el análisis canónico de correspondencias podría contribuir a mejorar los criterios de clasificación de uso del suelo.

La estructura comunitaria de los arroyos analizados en base a los diferentes usos del suelo según la clasificación, mostró un leve cambio en cuanto a la composición de especies. Los diferentes niveles de impacto estuvieron asociados a un aumento en la carga de nutrientes en los arroyos, los cuales se pueden ver afectados en su productividad primaria y en la calidad del agua y tienen efectos sobre los flujos de energía entre los niveles tróficos, afectando a los consumidores (Warry et al., 2018). Esto se evidencia en la presencia de especies omnívoras de pequeño tamaño, las cuales estuvieron presentes en todos los grupos de usos del suelo pero fueron dominantes y representan más del 95 % de la abundancia relativa total en los arroyos urbanos (U). Este tipo de uso del suelo se caracterizó por poseer la máxima concentración de nutrientes promedio (PT=1487 ug/L, NT= 4900 ug/L), la menor abundancia (2171 individuos) y riqueza (14 especies) y solo 355 g de biomasa total, características asociadas a ambientes con un claro deterioro en cuanto su calidad de agua (Casatti et al., 2006; 2009; Kühn et al., 2010; Casatti et al., 2012).

El tipo de alimentación predominante en todos los grupos de usos del suelo fue la omnívora, lo que era de esperar ya que en los arroyos de Uruguay estas especies están definidas como dominantes (Teixeira de Mello et al., 2009; 2012; Gonzalez-Bergonzoni et al., 2016). La omnivoría es el principal tipo de alimentación que poseen los peces en arroyos subtropicales. Estos individuos generalistas cuentan con una gran plasticidad fenotípica la cual les permite adaptarse de manera efectiva a cambios ambientales (Vidal et al., 2014). La especie omnívora que predominó en todos los grupos fue *C. decemmaculatus* (Cde) quien representó más del 90% de la abundancia relativa total en todos ellos, siendo particularmente abundante en los arroyos urbanos (U) donde fue dominante representando el 98% de la abundancia relativa total. Esto concuerda con lo planteado por los autores para sistemas impactados Gonzalez-Bergonzoni et al., 2016; Vidal et al., 2018)

En los arroyos G, A y AA los omnívoros e invertívoros fueron los más abundantes y los de menor abundancia fueron los piscívoros. Esta baja abundancia de los predadores top (piscívoros) en este tipo de ecosistema impacta directamente en la comunidad y calidad del agua (Nowlin et al., 2006) contribuyendo a la desestabilización de las redes alimenticias (Strictar-Pereira et al., 2016). En este sentido se puede ver como en los arroyos agrupados en AA, la presencia de *H.aff. malabaricus* (Hma) especie O-P considerada predador top (Balboni et al., 2011), estructura de tal manera la comunidad haciéndola más diversa ya que estabiliza las redes alimenticias (Nowlin et al., 2006; Strictar-Pereira et al., 2016). Los arroyos agrupados en AA contaron con un total de 19659 individuos y 34 especies, valores máximos para el total de los grupos de usos del suelo.

A menor abundancia de peces piscívoros mayor abundancia de peces de pequeño tamaño; como en este caso, que las especies más abundantes fueron Cde y *B. iheringii* (Bh) en G, A y solo Cde en AA, quienes de acuerdo a estudios con isotopos estables (Vidal et al., 2014) ocupan niveles tróficos bajos y son predados por especies de mayor tamaño como *O. jenynsii* (Oje) y Hma. Oje se ubicó dentro de las especies con menor abundancia relativa siendo esta menor al 1% del total. Esto explicaría la gran abundancia de especies omnívoras de tamaño pequeño lo cual acorta la longitud de la cadena alimenticia (Schmitz, 1992; Strictar-Pereira et al., 2016) y afectando directamente las interacciones de las diferentes especies que forma la red alimenticia de los sistemas (Novak y Wootton 2008).

La biomasa en relación a los usos del suelo mostro que las especies omnívoras también fueron las que presentaron valores mayores. La diferencia de biomasa entre los grupos de usos del suelo fue consecuencia de la presencia de especies de gran tamaño como Hma en AA, el cual obtuvo la mayor biomasa total (9348 g), mientras que en U la especie dominante fue Cde y el valor de biomasa total para el grupo fue el más bajo en comparación del resto. La comparación de la abundancia relativa y biomasa mediante las curvas acumuladas permitió confirmar la existencia de cierto grado de perturbación ambiental ya que para todos los usos del suelo la curva de abundancia estuvo por encima de la de biomasa (Warwick y Clarke,

1994). Este patrón fue descrito en comunidades de peces similares asociados a una marcada pérdida de biomasa a medida que aumenta la abundancia relativa en ambientes perturbados (Mice et al., 2018).

Si bien no se calculó el índice W (no se contó con el programa PRIMER que permite comparar la diferencia entre ambas curvas y calcular el índice), el análisis de resultados se realizó en base a diagrama de curvas para ecosistemas similares en la región (Herrera-Valdivia et al., 2015; Sá-Oliveira et al., 2015; Santos et al., 2015; Mice et al., 2018). En este sentido se pudo determinar que en el caso de G, si bien la curva de abundancia está por encima de la biomasa las curvas están más cercanas, lo que nos permitió inferir la existencia de un nivel de perturbación más moderado (Herrera-Valdivia et al., 2015), en comparación al resto de los grupos. En los grupos A y AA la pérdida de biomasa en comparación a la abundancia está asociada a cambios en composición de especies, donde predominan especies tolerantes que son nadadores activos de la columna de agua (Santos et al., 2015). Por último, en los arroyos urbanos la pérdida de biomasa es marcada y abrupta en comparación con la abundancia relativa, patrón que es común en estos ambientes (Pinto et al., 2006; Mice et al., 2018) y está asociado a niveles altos de perturbación (Clarke y Warwick, 2001). La pérdida de biomasa está asociada al aumento de perturbaciones ambientales (Allan y Castillo, 2007), como consecuencia del aumento de la proporción de peces pequeños y la reducción general de la talla promedio comunitaria, que también fue observada en arroyos de Uruguay (Teixeira de Mello et al., 2012).

La mayor abundancia relativa y biomasa en los arroyos analizados estuvieron asociadas a la presencia de especies omnívoras tolerantes como Cde (Vidal et al., 2018) y Gter (Yaffe et al., 2002) en biomasa. Su tolerancia a grandes cambios ambientales, como por ejemplo su capacidad de vivir bajo niveles de nutrientes elevados, es característica de ambientes impactados como sitios eutrofizados (Yaffe et al., 2002; Gonzalez-Bergonzoni et al., 2016; Loureiro et al., 2016; Vidal et al., 2018) lo que las convierte en especies indicadoras de cuerpos de agua de baja calidad.

Por su parte la riqueza de especies, junto con la diversidad y la equidad ampliamente utilizadas para evaluar la degradación de niveles en los ecosistemas acuáticos (Fausch et al., 1990), mostraron cierto nivel de impacto. Los mismos tendieron a disminuir con el incremento de la degradación del hábitat asociada a los usos del suelo, patrones asociados a perturbaciones ambientales (Karr et al., 1986). Esto se observó claramente en las comunidades aquí analizadas cuyos resultados estuvieron asociados al gradiente de impacto ambiental desde aquellos arroyos agrupados en G menos impactados, hasta los muy impactados agrupados en U. Los arroyos agrupados en G, mostraron mayor índice de diversidad (H'), equitatividad (J) y menor dominancia de especies (B). En los arroyos agrupados en U se observó la menor diversidad y equitatividad de especies, lo cual se asoció al valor máximo para B demostrando la existencia de dominancia completa por parte de una sola especie, Cde.

Los arroyos agrupados en AA presentaron valores mayores que A y una mayor dominancia de especies. Esto concuerda con lo registrado previamente para arroyos asociados a áreas urbano-industriales en

Uruguay (Teixeira de Mello, 2007; Zarucki et al., 2011). Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por otros autores para la región, donde a mayor nivel de impacto menor riqueza y abundancia de especies, aumentando así la dominancia por una sola especie omnívora tolerante (Bistoni et al., 1999; Quintans et al., 2009; Casatti et al., 2012), particularmente Cyprinodontiformes como *C. decemmaculatus* (Cde) (Casatti et al., 2006).

El análisis canónico de correspondencia (CCA) si bien no fue significativo, mostró un patrón claramente determinado por las variables que determinan la conductividad, el oxígeno disuelto y el pH, en contraste con aquellas que indican eutrofización (PT y NT). Los arroyos agrupados en U se diferencian del resto de los tres grupos de uso, principalmente por la mayor concentración de nutrientes (NT y PT) y por los menores valores de conductividad, oxígeno y pH; desde el punto de vista de las especies, se relacionaron con Cde y el resto de los omnívoros de pequeño tamaño con excepción de *O. arnoldi* (Oar), especie H-D. Estos resultados verifican los resultados anteriormente discutidos, asociando los patrones del aumento de especies omnívoras de pequeño tamaño y disminución de la diversidad como consecuencia del impacto ambiental y la disminución de la calidad de agua (Casatti et al., 2006; Burrell et al., 2013; Chalar et al., 2013).

C. decemmaculatus (Cde) fue la especie que caracterizó las comunidades de peces aquí analizadas. Especie vivípara, de fertilización interna y dimorfismo sexual, característica de sitios perturbados (Bistoni et al., 1999; Hued y Bistoni, 2005; Bonifacio et al., 2016). La relevancia de esta especie radica en que como todo omnívoro, es capaz de amortiguar efectos ambientales desestabilizantes y trasladar los impactos a través de diferentes niveles de la red alimentaria mientras la abundancia de recursos varía (Fagan, 1997) y el sistema vuelve a encontrar un nivel de equilibrio. Desde este punto de vista existen antecedentes para esta especie en Uruguay en ambientes muy degradados (Quintans et al., 2009; Benejam et al., 2016; Vidal et al., 2018). Este impacto afecta a las comunidades direccionándolas hacia aumentos en especies tolerantes, generalistas, oportunistas lo que ocasiona el declive de especies sensibles (Teixeira de Mello et al., 2007; Casatti et al., 2009; Quintans et al., 2009; Charlar et al., 2013) y disminuye en diversidad de peces (Klein, 1979; Steedman, 1988; Alexandre et al., 2010). De acuerdo a Vidal et al., (2018) esta especie resulta un potencial indicador de masculinización, como consecuencia de la presencia de disruptores endocrinos en el agua.

Estos resultados, si bien refieren en su mayoría al gradiente de impacto asociado a las concentraciones de NT y PT afectando directamente desde el punto de vista químico a los arroyos, también sugieren la existencia de efectos de los cambios físicos sobre la calidad del agua (Casatti et al., 2006; Allan y Castillo, 2007). Los cambios físicos se relacionaron con la ausencia de árboles y arbustos en áreas aledañas a las cuencas analizadas, sobre todo en los grupos AA y U. La importancia de conservación del hábitat físico para la estructuración de las comunidades de peces reflejada en la variación de los índices de diversidad y equitatividad entre los diferentes grupos de usos del suelo está en concordancia con lo postulado por Casatti et al. (2012), quien plantea que la conservación de la zona riparia es uno de los principales factores que

influyen sobre la estructura y mantenimiento de la complejidad del hábitat dentro del arroyo. Esto se observó claramente en arroyos asociados a zonas urbanas, donde la erosión del suelo afecta el intercambio de materia orgánica entre los ecosistemas terrestres y acuáticos (Casatti et al., 2012; Warry et al., 2018). Dicho intercambio favorece los aportes alóctonos de material orgánico como las hojas y ramas, las cuales sirven como sustrato para el desarrollo de microorganismos quienes son alimento para invertebrados y peces (Angermeier y Karr, 1983; Pusey y Arthington, 2003). Esto afecta la ingesta reducida de estos elementos y está asociada a una reducción en el número de especies y biomasa de peces (Angermeier y Karr, 1983; Lester et al., 2007; Schneider y Winemiller, 2008) tal como muestran los resultados analizados en este trabajo.

Los arroyos aquí analizados mostraron cierto nivel de impacto bajo forma de gradiente (Ganadero (menos impactado), Agrícola, Agrícola - ganadero, Urbano (mas impactado) asociado a actividades humanas ya que su comportamiento responde a lo descrito por otros autores (Chalar et al., 2013; Mise et al., 2018). Estos impactos han modificado las características físicas, químicas y bióticas de dichos ecosistemas acuáticos lo cual afecta directamente la abundancia y la composición de especies (Malmqvist y Rundle, 2002; Englert et al., 2015), como resultado de prácticas agrícola y urbanas (Mise et al., 2018), aunque la presencia de Cde en todos los grupos no descarta efectos perjudiciales también de actividades ganaderas.

Capítulo II: Análisis del efecto de uso del suelo a nivel poblacional

Introducción

Fuentes no puntuales de contaminación como la agricultura y el aumento de las áreas urbanizadas, impactan sobre la calidad del agua de ríos y arroyos mediante el vertido de metales a través los efluentes domésticos, fertilizantes minerales y pesticidas (Alloway, 1995; Richards et al., 1996; Aonhgusa y Gray, 2002; Ergene et al., 2007a, b; et al., 2010; Alexander et al., 2017). Estos causan efectos acumulativos no reversibles sobre las poblaciones de peces que habitan esos ecosistemas acuáticos (Ergene et al., 2007b; Hussain et al., 2018) por lo tanto, determinar los efectos de las diferentes actividades humanas sobre los sistemas acuáticos, constituye uno de los problemas más relevantes en el campo de la ecotoxicología (Ergene et al., 2007 a, b; Van den Brink, 2008; Wilson et al., 2014; Asker et al., 2015; Feld et al., 2016).

Para la identificación de diferencias entre las respuestas biológicas debidas al estrés natural y las inducidas por presiones antrópicas son necesarias herramientas sensibles que no solo analicen efectos a nivel del organismo sino que también tengan en cuenta la evaluación de la salud de los ecosistemas (Fonseca et al., 2011; Gusso-Choueri et al., 2015, 2016). Tales herramientas incluyen biomarcadores que permiten establecer relaciones entre la exposición a diferentes sustancias químicas y sus efectos sobre la salud del individuo expuesto (Oliva et al., 2012; Pustiglione et al., 2018; Hussain et al., 2018) cuantificando así cambios en la respuesta biológica como consecuencia a la exposición de sustancias tóxicas (Asker et al., 2015). Los mismos son utilizados sobre indicadores biológicos (bioindicadores), organismos centinelas, sobre los cuales se manifestarán o no los efectos ambientales permitiendo la evaluación de cambios en el medio ambiente y pueden utilizarse para diagnosticar la causa del problema ambiental (Wilson et al., 2014) y la condición del medio ambiente y el monitoreo de las tendencias de la condición a lo largo del tiempo (Cairns et al., 1993). El gradiente de respuestas observadas en los diferentes bioindicadores frente a diferentes grados de impacto ha sido empleado como herramienta de monitoreo biológico (biomonitoreo) (Zaldívar et al., 2008; Alexandre et al., 2010; Giltrap et al., 2017).

Los peces son el modelo de vertebrados más utilizado como bioindicador para el monitoreo acuático (Karr 1981; Teixeira de Mello et al., 2015) y por su rol dentro de los ecosistemas acuáticos, son bioindicadores ideales ya que abarcan varios eslabones de la cadena alimenticia, son capaces de acumular sustancias tóxicas y reaccionan fácilmente a bajas concentraciones de agentes tóxicos (Minissi et al., 1996; Gustavino et al., 2001; Torres-Bugarin et al., 2007; Hussain et al., 2016; Benejam et al. 2016; Giltrap et al., 2017). Su respuesta a restricciones ecológicas y ambientales depende de la relación entre las condiciones ambientales y su capacidad adaptativa, ya que ellos muestran diversas estrategias adaptativas desde el punto de vista del crecimiento, la reproducción y la supervivencia (Arendt, 1997).

Para la evaluación del estado de salud de un cuerpo de agua son necesarios abordajes que utilicen múltiples biomarcadores, lo cual permite la relación de diferentes efectos y la obtención de una imagen más holística del impacto de los contaminantes sobre los organismos acuáticos y el sistema (Barsiene et al., 2006; Lehtonen et al., 2006; Cazenave et al., 2009; Wilson et al., 2014; Asker et al., 2015). A nivel poblacional las diferentes estrategias adaptativas y respuestas se evidencian por medio de biomarcadores somáticos los cuales se asocian a diferentes órganos y tejidos diana, como el hígado (Avci et al., 2005, Giltrap et al., 2017), branquias (Sayeed et al., 2003; Jebali et al., 2013) y sangre (Costa et al., 2011; Çavaş y Ergene, 2005; Witeska, 2013; Da Silva Correa et al., 2016). Estos biomarcadores manifestarán el impacto de cambios en el ambiente como efectos a nivel de órganos y se denominan señales de alarma tardía (Aito y Kallio, 1999; Hyun-Mi et al., 2006).

Los biomarcadores somáticos comúnmente utilizados son el índice gonadosomático (IGS), el índice hepatosomático (IHS) y el factor de condición relativo (Kr) (Wilson et al., 2014; Ballesteros et al., 2017; Giltrap et al., 2017). El IGS, relacionado directamente con el sexo, edad y estadio reproductivo del individuo (Smith, 2004), indica el grado de desarrollo gonadal en relación al ciclo o estado de madurez, proporcionando información estructural, más que funcional, respecto de la salud y al estado de la maduración gonadal (De Vlaming et al., 1981; Sadekarpawar y Parikh, 2013). Dado que existe una relación proporcional entre el peso del cuerpo y el peso de la gónada, la exposición a contaminantes ambientales produce alteraciones en las gónadas, cambios morfológicos y disminuye el IGS (Choudhury et al., 1993; Sakamoto et al., 2003). Por otro lado el IHS vincula posibles alteraciones a nivel hepático con las principales funciones como la síntesis y degradación de hormonas y la detoxificación de compuestos foráneos (Giltrap et al., 2017; Landa y Antolinez, 2017). Proporciona una estimación del estado de salud del individuo, mediante la relación entre el peso del cuerpo y el peso del hígado, por tal motivo es utilizado como un bioindicador de exposición a contaminantes (Sadekarpawar y Parikh, 2013). El Kr permite evaluar la salud y la condición fisiológica de la población (Richter, 2007; Rypel y Richter, 2008.). El estado fisiológico se determina por medio de la relación del peso y longitud del individuo, siendo los valores mayores asociados a una mejor condición (Froese, 2006). Cambios en las relaciones permite comparar la historia de vida entre diferentes poblaciones (Binohlan y Pauly, 1998; Froese, 2006; Rodriguez et al., 2017). La relación longitud-peso junto con el factor de condición relativo son marcadores de gran interés en la biología de poblaciones de peces, ya que proporcionan información indirecta sobre el crecimiento, la madurez, la reproducción, la nutrición y el estado de salud de las poblaciones (Cifuentes et al., 2012), permitiendo efectuar estudios comparativos interpoblacionales (Granado 1996; Arismendi et al., 2011), que luego pueden ser usados en modelos predictivos del comportamiento o dinámica, tanto de la población como de la comunidad (McCallum, 2000).

Objetivo general

Evaluar el impacto de los diferentes usos del suelo sobre la calidad del agua en arroyos mediante el análisis de poblaciones de peces como bioindicadores mediante la utilización de biomarcadores somáticos.

Objetivos específicos

- Analizar el estado de las poblaciones de dos especies centinelas de peces mediante biomarcadores somáticos; índice hepatosomático y gonadosomático.
- Evaluar la condición y el estado de las poblaciones de dos especies centinela de peces mediante el análisis de la relación largo - peso y del factor de condición relativo.

Hipótesis

Los usos del suelo impactan de manera diferente sobre las poblaciones de peces, lo que se refleja en los bioindicadores morfológicos con diferentes efectos a nivel de órganos (hígado y gónadas) y sobre el estado fisiológico de los individuos.

Predicciones

- I-En arroyos asociados a usos del suelo con mayor impacto ambiental los índices hepatosomático y gonadosomático presentaran valores diferentes a los que se pueden obtener con arroyos menos impactados.
- II-En los arroyos con menor nivel de impacto el factor de condición relativo es mayor que en los más impactados.

Materiales y Métodos

Especies centinela

A partir de los resultados obtenidos en el análisis comunitario, se seleccionaron dos especies centinelas para el análisis poblacional. Dado que las especies responden de manera diferente a las presiones y cambios ambientales (Seriani et al., 2011) se eligieron dos especies de hábitos alimenticios diferentes y cuantitativamente bien representadas en el muestreo comunitario. *Bryconamericus iheringii* y *Gymnogeophagus terrapurpura* (figura 2.1), ambas presentes en la mayoría de los arroyos muestreados. Estas son especies nativas de fácil identificación, ciclos de vida y desarrollo *in situ*, ciclo reproductivo corto, no migran grandes distancias y se diferencian en sus hábitos alimenticios; *B.iheringii* es omnívoro, alimentándose principalmente de algas y detrito y en menor proporción de invertebrados acuáticos (Teixeira de Mello et al., 2011) y de hábitos pelágicos (Marinowic et al., 2012), mientras que *G. terrapurpura* también omnívoro, se alimenta de invertebrados y algas adheridas al sustrato (perifiton) (Teixeira de Mello et al., 2011) pero tiene hábitos bento-pelágicos (Loureiro et al., 2016).

El manejo de ejemplares vivos a campo se realizó de acuerdo al protocolo de manejo de peces para biomonitoreo n°170 aprobado por la comisión de ética en el uso de animales (CEUA) en febrero de 2016.



Figura 2.1. Ejemplares de *B. iheringii* (derecha) (foto de F. Teixeira de Mello) y *G. terrapurpura* (izquierda) fijados en alcohol.

Área de estudio

De los 27 arroyos relevados para el análisis comunitario (capítulo I) se seleccionaron aquellos donde las especies centinelas estuvieran presentes excluyéndose los arroyos urbanos dado que, de acuerdo al muestreo piloto primario, la composición y abundancia de especies en estos sitios fue muy baja. Los datos de parámetros fisicoquímicos del agua y nutrientes fueron los mismos que los analizados para el análisis de las comunidades (Capítulo I).

Muestreo de peces y procesamiento de muestras

Las especies centinelas estuvieron presentes en 15 de los 27 arroyos seleccionados. A partir de los ejemplares fijados en alcohol 70 % se seleccionaron 20 individuos de cada especie por arroyo, tratando de cubrir todo el rango de tallas para cada población. De cada individuo se registró largo estándar L_s (cm), peso total P_t (g), peso eviscerado P_{evis} (g), se extrajeron gónadas e hígado y se pesaron ambos (P_g y P_h (g) respectivamente).

Análisis de datos

Se analizaron las relaciones longitud estándar-peso y longitud estándar – peso eviscerado por especie $P_t = aL^b$ (Ricker, 1973), mediante el modelo de regresión lineal bivalente (Warton et al., 2006) y la significancia del coeficiente de correlación (r) y la pendiente (b), se analizó por medio del test t de Student (Zar, 2010), previa transformación logarítmica de los datos.

Se verificó la hipótesis de crecimiento isométrico ($b=3$) (Ricker, 1973; Froese 2006), mediante el test t de Student (Zar, 2010).

Se calculó el factor de condición relativo (K_r) (Froese, 2006): $K_r = P_t/P_e$ (donde P_t peso total del individuo; P_e = peso estimado, a partir de la ecuación $P_t = aL^b$), el índice hepatosomático (IHS): como $IHS =$

(peso hígado * 100) / peso total (eviscerado) y el índice gonadosomático (IGS): $IGS = (\text{peso gónada} * 100) / \text{peso total (eviscerado)}$

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante métodos no paramétricos a excepción de los datos de nutrientes los cuales cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas (test de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente) (Zar, 2010). Todos los análisis se realizaron con el programa Past program versión 3.21 (Hammer, et al., 2001), con un nivel de significancia de $p=0,05$ para todos los casos.

Mediante el coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman (rs) (Zar, 2010), se analizaron las diferentes relaciones entre los biomarcadores somáticos.

Resultados

En los 15 arroyos seleccionados se analizaron un total de 384 individuos, 168 pertenecientes a *B. iheringii* (Bi) y 216 a *G. terrapurpura* (Gt). En los arroyos Cochengo, Nuevo 10, de La Pedrera, de Las Violetas, Feliciano y Vejigas chico no se hallaron ejemplares de *B. iheringii* y en el arroyo Totoral se colectó un solo ejemplar de *G. terrapurpura* (tabla 2.1). Para Bi la talla máxima fue de 6,7 cm y la mínima de 1,5 cm; en cuanto al peso total, el máximo fue de 8,154 g y el valor mínimo fue de 0,119 g; para ambos parámetros el máximo y mínimo se ubicaron en los arroyos Insaurreal y cañada del Dragón respectivamente. Para Gt la talla máxima fue de 8,6 cm y el peso máximo fue de 26,012 g, ambos en el arroyo Juncal, por su parte en la cañada del Dragón se observó la talla mínima de 1,1 cm y el peso total mínimo fue de 0,079 g en el arroyo Feliciano. Los parámetros fisicoquímicos y la concentración de nutrientes en agua fueron los mismo utilizados para el análisis comunitario pero solo se incluyeron los sitios seleccionados para el análisis de biomarcadores somáticos.

La relación largo-peso total y largo-peso eviscerado ajustó al modelo lineal con los datos transformados, ya que r fue significativo para todos los casos. El coeficiente de determinación (r^2) mostro que en todos los casos el 96% del peso fue explicado por el tamaño (tabla 2.2). El test de Student para los valores de b solo fue significativo para Bi en el arroyo Juncal, Sauce de Berna y Cañada del dragón y para Gt en el arroyo Cochengo, Juncal, Sauce de Berna, Pando y Negro Paciencia. A excepción del Sauce de Berna para Bi el cual mostro un valor de b significativamente mayor a 3 indicando alometría positiva en el resto de los casos para ambas especies los valores de b indicaron crecimiento de tipo alométrico negativo.

Tabla 2.1. Estructura de tallas (Ls) y peso total (Pt) de las poblaciones de peces muestreadas para las especies centinelas. N: número total de individuos, Ls: largo estándar, Pt: peso total. (G: ganadero, A: agrícola; AA: agrícola-ganadero).

Uso del suelo	Arroyo	Bi					Gt				
		Ls(cm)			Pt (g)		Ls(cm)			Pt (g)	
		N	max	min	max	min	N	max	min	max	min
G	Insaurral	20	6,7	2,4	8,154	0,397	20	6,8	1,9	10,425	0,271
	Cochengo						10	3,5	1,2	1,522	0,086
A	Juncal	20	6,1	2,3	6,135	0,333	20	8,6	1,2	26,012	0,175
	Nuevo 10						20	7,5	2	19,242	0,429
	De la Pedrera						4	4,3	3	3,342	1,185
	Sauce de Berna	20	6,4	1,9	6,299	0,121	20	7,4	1,7	19,063	0,336
	Cañada del Dragon	20	6,1	1,5	5,267	0,119	2	1,9	1,1	0,236	0,151
	De las Piedras	20	4	2,1	1,085	0,144	20	6,2	1,4	9,965	0,292
	Durán	20	4,8	1,7	2,924	0,127	18	7,2	1,5	14,38	0,183
AA	Totoral	20	6,2	2	5,77	0,242	1	1,9		0,28	
	Pando	20	6,2	2,6	6,118	0,334	20	7,7	1,8	16,716	0,304
	Negro Paciencia	8	5,4	1,9	3,265	0,143	20	8,1	1,5	20,525	0,242
	De las violetas						4	6,7	4,8	12,426	4,318
	Feliciano						17	6,5	1,3	11,39	0,079
	Vejigas chico						20	7,5	1,4	18,223	0,217

De acuerdo a los usos del suelo el factor de condición relativo (K_r) para el test de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas entre especies tanto para machos ($H_{Kr}=1,421$; $p=0,922$) como para hembras ($H_{Kr}=1,991$; $p=0,8504$) (figura 2.2). Los machos variaron entre 14- 0,61 y entre 11,6-0,77 y las hembras mostraron valores de 1,76-0,54 y 1,60-0,58 para Bi y Gt respectivamente.

Tabla 2.2. Resultados relación largo-peso total y largo-peso eviscerado, ajuste modelo potencial de los individuos utilizados para el análisis de biomarcadores somáticos. (tipo de crecimiento: $b=3$ isométrico, $b<3$ alométrico negativo, $b>3$ alométrico positivo). *Significativos para test de Student ($p<0,05$). (a: valor del intercepto; b: valor pendiente, r: coeficiente de correlación, r^2 : coeficiente de determinación).) (G: ganadero, A: agrícola; AA: agrícola –ganadero).

		Bi				Gt			
Uso del suelo	Arroyo	Total							
		a	b	r	r2	a	b	r	r2
G	Insaurral	0,0392	2,6617	0,951*	0,904	0,045	2,968	0,991*	0,984
	Cochengo					0,047	2,747*	0,996*	0,994
A	Juncal	0,0347	2,859*	0,996*	0,992	0,072	2,700*	0,992*	0,984
	Nuevo 10					0,042	2,992	0,994*	0,990
	De la Pedrera					0,149	1,945	0,907	0,824
	Sauce de Berna	0,0164	3,264*	0,9962	0,993	0,063	2,795*	0,995*	0,990
	Cañada del Dragon	0,0334	2,787*	0,992*	0,986	0,140	0,817	1 *	1
	De las Piedras	0,0176	3,211	0,901*	0,813	0,076	2,59	0,983*	0,967
	Durán	0,029	2,855	0,978*	0,958	0,035	3,097	0,993*	0,988
	Totoral	0,0306	2,853	0,878*	0,772				
AA	Pando	0,0202	3,163	0,994*	0,988	0,060	2,788 *	0,995*	0,991
	Negro Paciencia	0,032	2,824	0,980*	0,961	0,065	2,698*	0,995*	0,992
	De las violetas					0,046	2,898	0,988*	0,977
	Feliciano					0,035	3,053	0,992*	0,985
	Vejigas chico					0,056	2,811	0,988*	0,977
		Eviscerado							
Uso del suelo	Arroyo	a	b	r	r2	a	b	r	r2
G	Insaurral	0,0242	2,776	0,958*	0,9186	0,0401	2,945	0,992*	0,9845
	Cochengo					0,0356	2,728*	0,994*	0,99
A	Juncal	0,024	2,924*	0,995*	0,9919	0,0582	2,737*	0,990*	0,9804
	Nuevo 10					0,0282	3,124	0,993*	0,988
	De la Pedrera					0,1224	1,957	0,89783	0,8061
	Sauce de Berna	0,0154	3,148*	0,997*	0,9941	0,0534	2,830*	0,995*	0,9903
	Cañada del Dragon	0,0162	3,067*	0,994*	0,9894	0,1163	0,672	1*	1
	De las Piedras	0,0147	3,166	0,901*	0,8116	0,0619	2,642	0,983*	0,9667
	Durán	0,0239	2,747	0,958*	0,919	0,0227	3,266	0,994*	0,9897
	Totoral	0,0202	2,958	0,985*	0,9713				
AA	Pando	0,0138	3,237	0,993*	0,9862	0,0376	2,961*	0,994*	0,9881
	Negro Paciencia	0,0456	2,173	0,915*	0,8373	0,0438	2,841*	0,991*	0,9824
	De las violetas					0,0363	2,961	0,986*	0,9725
	Feliciano					0,0186	3,323	0,977*	0,9559
	Veijigas chico					0,0385	2,938	0,988*	0,9779

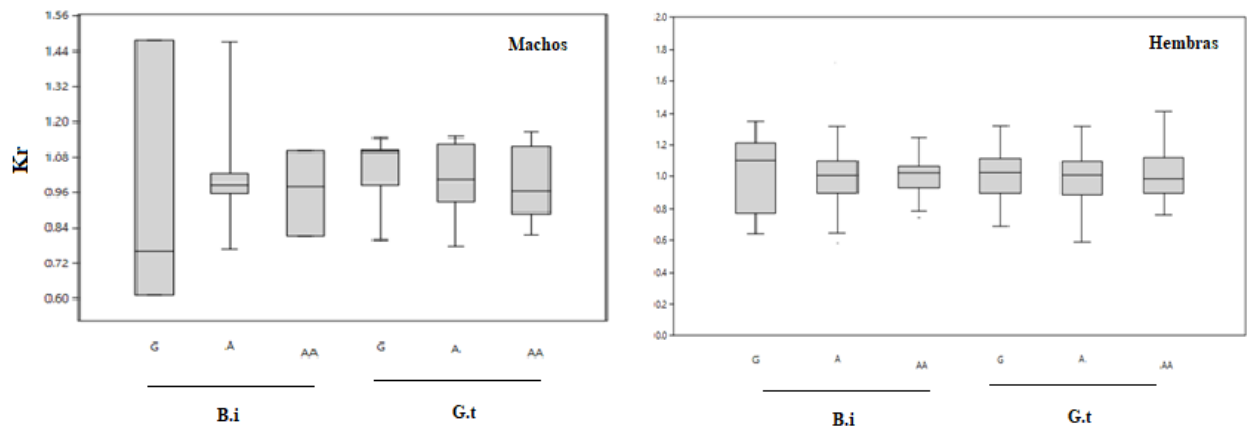


Figura 2.2. Factor de condición relativo (Kr) para machos y hembras de B.i (*B. iheringii*) y G.t (*G. terrapurplea*) según los usos del suelo (G: ganadero, A: agrícola ; AA: agrícola-ganadero).

El índice hepatosomático (IHS) y el índice gonadosomático (IGS) mostraron diferencias significativas solo para las hembras de ambas especies ($H_{c\ IHS}=38,72$, $p=2,703 \times 10^{-7}$; $H_{c\ IGS}=17,77$, $p=0,00325$) (figura 2.3). En el caso del IHS, los machos de Bi mostraron valores entre 2,21% - 0,30 % observándose su máximo en A y mientras que en Gt los valores fueron entre 4 %-0,70 %, observándose su máximo en los arroyos agrupados en G. En el caso de las hembras de Bi los valores oscilaron entre 8,01 % y 0,09 % y para Gt lo hicieron entre 8,29 % y 0,30 %, en ambos casos el máximo valor se observó en los arroyos agrupados en AA. Respecto al IGS, los valores para los machos de Bi estuvieron comprendidos entre 1,47 % y 0,068%, y para los individuos Gt variaron entre 0,81% y 0,054%, en ambos casos el máximo se observó en los arroyos agrupados en A. Para las hembras el rango de variación fue más amplio, para Bi varió entre 4,54% y 0,035 % y para Gt 1, 79% y 0,024 %, observándose los máximos en los arroyos agrupados en G y en A respectivamente.

El análisis no paramétrico multivariado de la varianza (NPMANOVA) para IHS, IGS Kr no mostró diferencias significativas entre especies según los usos del suelo, pero si se encontraron diferencias significativas en las hembras Bi entre usos del suelo ($F= 12,92$, $p= 0,0002$) y estas diferencias fueron entre G- A ($p= 0,0003$) y A-AA ($p= 0,0228$).

La correlación de Spearman entre los índices calculados (IHS, IGS) y el factor de condición relativo para el peso eviscerado (Kr evis) de ambas especies según sexo y uso del suelo fue significativa solo para el IGS en hembras de Gt en los arroyos agrupados en A y en AA (tabla 2.3).

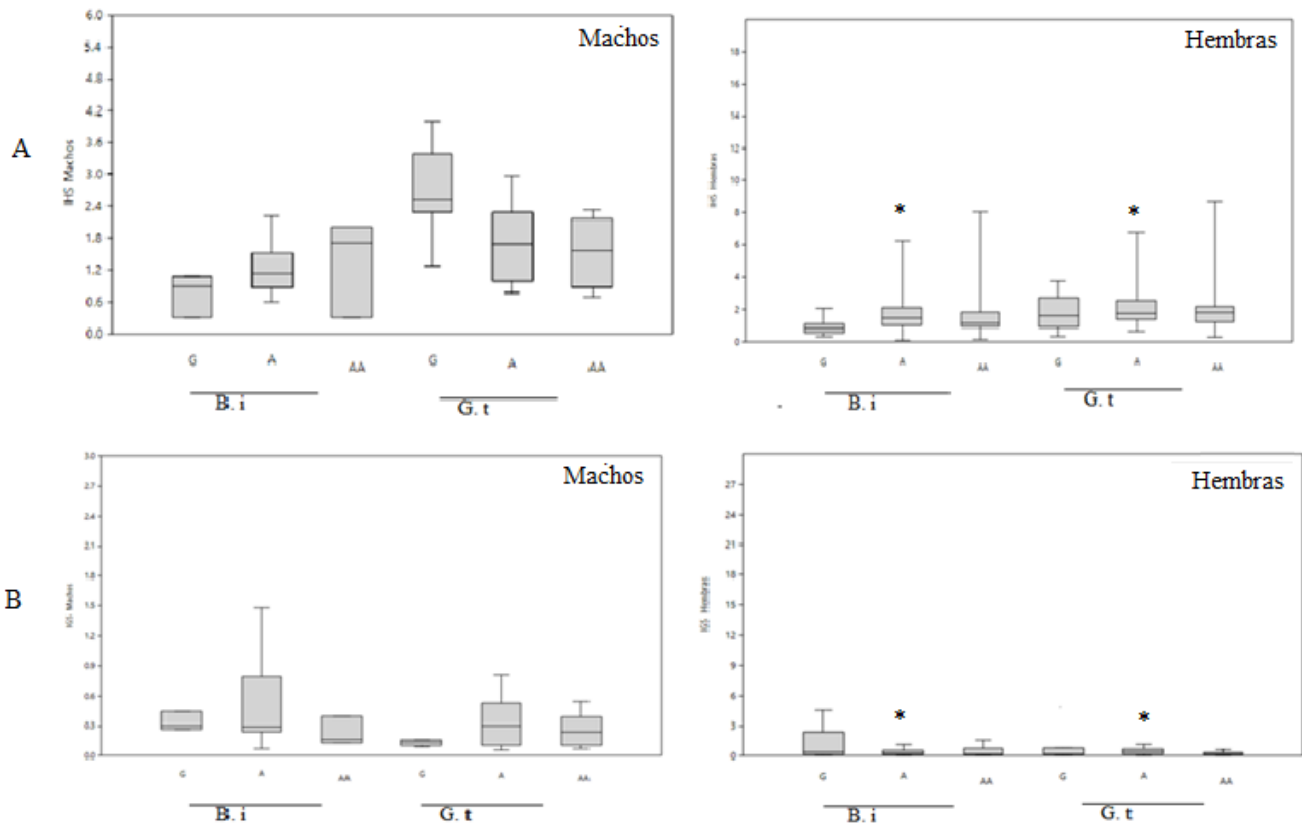


Figura 2.3. Índice hepatosomático (IHS) y gonadosomático (IGS) para machos y hembras de *B. iheringii* (B.i) y *G. terrapurplea* (G.t) según los usos del suelo. (A: IHS; B: IGS)(G: ganadero, A: agrícola; AA: agrícola-ganadero). * Significativos $p < 0,05$

Por otra parte, la correlación entre el IGS y el IHS no mostró diferencias significativas en ningún caso (tabla 2.4), pero si permitió observar una diferencia en cuanto a la tendencia en relación a las especies. Tanto Bi como Gt tuvieron relaciones inversas según los diferentes usos del suelo, para los arroyos G Bi se correlacionaron positivamente a diferencia de Gt que lo hizo negativamente para los sitios A y AA. Para Bi los índices se correlacionaron de manera negativa a diferencia de Gt quien mostro correlación positiva tanto para machos como para hembras respectivamente

La correlación de los índices (IHS e IGS) y el largo estándar (Ls) mostró un comportamiento diferente entre ambas relaciones. La correlación entre el IHS y Ls fue negativa en todos los casos pero solo fue significativa para las hembras de Gt en los arroyos agrupados en G, las hembras de Bi y Gt en A y para los machos y hembras de Gt en los sitios AA (tabla 2.5). En contraposición al IHS, la relación entre IGS y Ls fue positiva en todos los casos a excepción de los machos de ambas especies en los arroyos G. Esta relación mostró diferencias significativas solo para las hembras de ambas especies.

Tabla 2.3. Resultado de la correlación de Spearman entre los índices hepatosomatico (IHS), gonadosomatico (IGS) y el factor de condición relativo para peso eviscerado (Kr evis) por especie (Bi: *B. iheringii*; Gt: *G. terrapurple*) por sexo según los usos del suelo (G: ganadero, A: agrícola; AA: agrícola-ganadero). (r_s : estadístico de Spearman, p: valor asociado .*valores significativos <0,05)

Usos del suelo	Sexo	Bi					Gt				
		N	IHS-Kr evis		IGS-Kr evis		N	IHS-Kr evis		IGS-Kr evis	
			r_s	p	r_s	p		r_s	p	r_s	p
G	Machos	4	0,800	0,083	-0,400	0,416	5	0,100	0,783	-0,800	0,083
	Hembras	16	0,291	0,27	-0,0088	0,974	25	0,077	0,712	-0,065	0,757
A	Machos	13	-0,355	0,231	-0,192	0,529	15	-0,100	0,722	-0,078	0,781
	Hembras	87	-0,001	0,987	0,187	0,080	89	-0,055	0,603	-0,224	0,030 *
AA	Machos	3	0,500	1,00	-1,00	0,333	10	0,248	0,488	-0,006	0,986
	Hembras	45	0,030	0,84	0,086	0,572	71	0,118	0,324	-0,26	0,028 *

Tabla 2.4 Resultados de la correlación de Spearman entre los índices gonadosomatico (IGS) y hepatosomatico (IHS) por especies (Bi: *B. iheringii*; Gt: *G. terrapurple*) por sexo según los usos del suelo (G: ganadero, A: agrícola ; AA: agrícola-ganadero).(r_s : estadístico de Spearman, p: valor asociado

Usos del suelo	Sexo	Bi			Gt		
		N	IGS-IHS		N	IGS-IHS	
			r_s	p		r_s	p
G	Machos	4	0	1	5	-0,100	0,783
	Hembras	16	0,423	0,100	25	-0,259	0,211
A	Machos	13	-0,126	0,680	15	0,300	0,271
	Hembras	87	-0,004	0,960	89	0,0004	0,996
AA	Machos	3	-0,500	1,000	10	0,139	0,700
	Hembras	45	-0,081	0,595	71	0,193	0,430

Tabla 2.5.Resultados de la correlación de Spearman entre los índices hepatosomatico (IHS) y gonadosomatico (IGS) y el largo estándar medido (Ls) por especies (Bi: *B. iheringii*; Gt: *G. terrapurple*) por sexo según los usos del suelo (G: ganadero, A: agrícola ; AA: agrícola-ganadero).(r_s : estadístico de Spearman, p: valor asociado. * Valores significativos <0,05)

Usos del suelo	Sexo	Bi					Gt				
		N	IHS-Ls		IGS-Ls		N	IHS-Ls		IGS-Ls	
			r_s	p	r_s	p		r_s	p	r_s	p
G	Machos	4	-0,800	0,083	-0,400	0,411	5	0,700	0,23	-0,500	0,452
	Hembras	16	-0,01	0,94	0,62	0,009 *	25	-0,500	0,010 *	0,430	0,030 *
A	Machos	13	-0,18	0,552	0,665	0,010 *	15	-0,490	0,06	0,302	0,270
	Hembras	87	-0,34	0,001 *	0,600	4,27x10 ⁻¹⁰ *	89	-0,586	1,5x10 ⁻⁹ *	0,369	0,0036 *
AA	Machos	3	-1,000	0,333	0,500	1,00	10	-0,9301	9,59 x10 ⁻⁵ *	0,100	0,770
	Hembras	45	-0,400	0,0058 *	0,651	1,28 x10 ⁻⁶ *	71	-0,4	0,00054 *	0,451	8,15x10 ⁻⁵ *

Discusión

La contaminación por enriquecimiento de nutrientes puede derivarse de fertilizantes y aguas residuales sin tratar o mal tratadas actividades asociadas tanto a los arroyos agrupados en A como en AA. Esto determina un estrés ambiental para los individuos resultado en problemas como la eutrofización, la hipoxia y anoxia los cuales favorecen el desarrollo de especies tolerantes (Cowx et al., 1986; Kennish, 2002; Yaffe et al., 2002; Alexander et al., 2017). De acuerdo a la colecta realizada en el mes de febrero de 2017, los individuos de *B. iheringii* (Bi) estuvieron ausentes en 6 arroyos de los 15 analizados, a diferencia de *G. terrapurpura* (Gt) quienes estuvieron presentes en todos los arroyos pero en los arroyos de La Pedrera, Totoral y de Las Violetas en menor número. Esta diferencias entre especies podría estar asociada a las características fisiológicas de cada una, siendo una más tolerante que otra a ambientes estresantes ya que la concentración de nitrógeno y fósforo totales (NT, PT) fue más alta en los sitios A y AA, donde Bi estuvo ausente lo que sugiere que dicha especie, es sensible en comparación a Gt, siendo afectada directamente por la baja concentración de oxígeno disuelto en agua (Aguilar y Gonzalez-Sansón, 2000; Sadekarpawar y Parikh, 2013). Esto está en concordancia con descripciones previas para Gt quien habita tanto en sistemas poco impactados (Gonzalez–Bergonzoni et al., 2016) como en sistemas con mayor carga de nutrientes (Yaffe et al., 2002). Esto también se asocia con las tallas y pesos en los diferentes arroyos, encontrándose los ejemplares más grandes de Bi en el arroyo Insaurreal de (G) y los más pequeños en la Cañada del Dragón de (A). En el caso de Gt los individuos más grandes se hallaron en el arroyo Juncal (A), los de menor talla en la Cañada del Dragón(A) y los de menor peso en el arroyo Feliciano (AA). Estos resultados reafirman la tolerancia de Gt, adaptada a niveles elevados de nutrientes como en los arroyos agrupados en A y AA a diferencia de Bi quienes solo mostraron talla y peso máximo asociado a arroyos con menor concentración de nutrientes.

Para los individuos de Gt los pesos fueron mayores en comparación a los de Bi; esto está asociado a sus características fisiológicas y sus diferentes estrategias alimenticias. De acuerdo a lo planteado por Carlander (1969) y Froese (2006), se esperaba que Gt tuviera un crecimiento de tipo alométrico positivo en los sitios A y AA, pero si bien los valores de b para algunos sitios tanto de Bi como de Gt fueron significativos, el crecimiento fue isométrico para todos los individuos analizados, a excepción de los individuos pertenecientes a Gt en los arroyo Cochengo, Juncal, Sauce de Berna, Pando y Negro Paciencia quienes mostraron un crecimiento de tipo alométrico negativo ya que su valor de b fue significativamente menor a 3; lo mismo se observó en los arroyos Juncal y Cañada del Dragón para Bi. En estos casos el crecimiento en longitud es preponderante al aumento del peso teniendo una morfología más elongada que el resto. Dicha característica podría deberse a que en el muestreo no se colectaron ejemplares abarcando todo el rango de tallas para la especie (Froese et al., 2011) sino que este rango fue acotado (1,9 a 1,1 cm de longitud) asociados a edades tempranas del desarrollo en especies de agua dulce (Jellyman et al., 2013).

El factor de condición relativo (Kr) no permitió determinar ninguna asociación ya que no existió ningún cambio significativo en los arroyos considerados de mayor impacto (A y AA) como era de esperar. Se observaron valores mayores en el caso de los machos, lo que sugiere que estarían en mejor condición en comparación a las hembras en el momento del muestreo.

Los índices hepatosomático y gonadosomático (IHS,IGS) mostraron valores significativamente mayores para las hembras de ambas especies en los arroyos agrupados en A siendo estos los de mayor concentración de nutrientes. Dado que el muestreo se realizó en época post desove para ambas especies (Lambert et al., 2004; Loureiro et al., 2016), los resultados obtenidos no concordaron con lo esperado para la época ya que valores máximos de IHS e IGS son esperables en individuos desovantes (Morgan y Lilly, 2006). Esto podría deberse a un cambio adaptativo como estrategia reproductiva tanto de la especie sensible, Bi, y la especie tolerante Gt (Alexander et al., 2017) o también podría darse un desove fraccionado.

Los valores para ambos índices fueron inferiores a lo esperado para la época de muestreo, lo que indicaría un desvío de la energía que habitualmente es destinada al crecimiento y maduración gonadal. Dicha estrategia podría ser una adaptación frente a un ambiente estresante, sobre todo en los arroyos agrupados en A y AA los cuales están asociados a mayor impacto ambiental (Morgan y Lilly, 2006; Cabrera Paez et al., 2008; Solé et al. 2010). El manejo y la reserva energética del individuo afecta el desove y la calidad de los huevos, teniendo un efecto directo sobre la tasa de fecundidad (Torf et al., 2004). Por lo tanto, siendo que el IGS está influenciado por los parámetros abióticos como la temperatura (no se encontraron diferencias significativas entre los sitios muestreados), fotoperiodo, oxígeno disuelto y disponibilidad de nutrientes entre otros, valores bajos están asociados a sitios contaminados, los cuales generan ambientes estresantes para el individuo el cual en pro de su supervivencia debe destinar su energía en la detoxificación y adaptación (Breitburg, 2002; Toft et al., 2003; Cabrera et al., 2008; Van Den Heuvel y Ellis, 2009). No necesariamente este aumento en el IHS implica una mejor condición hepática (Morgan y Lilly, 2006).

Las correlaciones del IHS con el Ls y el IGS con el LS mostraron que en los arroyos A y AA la correlación para el IHS fue negativa mientras la correlación IGS fue positiva tanto para machos y hembras de ambas especies. En estos arroyos donde los niveles de nutrientes son significativamente elevados, se evidencia el cambio de estrategia adaptativa antes mencionada. Diferente fue lo observado en los arroyos G, donde si bien la correlación para el IHS también fue negativa, la correlación del IGS con el Ls fue diferencial entre machos (negativa) y hembras (positiva). En éstas últimas la correlación entre IGS y Ls fue significativamente positiva. Dado que en la mayoría de los peces de agua dulce la principal reserva energética está en el hígado (Morgan y Lilly, 2006) pero en sitios impactados donde el *fitness* se ve disminuido la misma en momentos reproductivos se destina a la producción gonadal, esto demuestra la existencia de cambios en la disponibilidad de energía destinada a diferentes funciones vitales como respuesta adaptativa al estrés (Cabrera Paez et al., 2008; Hamilton et al., 2017). Este tipo de comportamiento afecta directamente la tasa reproductiva y el éxito de la población (Lloret y Planes, 2003; Hamilton et al., 2017).

El incremento del IHS como consecuencia de la exposición de los organismos a agentes estresantes ha sido descrito por varios autores (Kime 1998; Porter y Janz, 2003; Torf et al., 2003; 2004; Cabrera Paez et al., 2008) y por lo tanto un aumento en el IHS no implica una mejor condición. Toda exposición a contaminantes conduce a un aumento en el tamaño del mismo por hipertrofia y a un aumento en el número de hepatocitos (hiperplasia) o ambos (Adison, 1984; Solé et al. 2010). La significancia en el aumento del IHS para las hembras es consecuencia de la exposición de los individuos a agentes estresantes, siendo las hembras las más susceptibles a cambios en el ambiente (Kime 1998; Porter y Janz, 2003; Torf et al., 2003; 2004; Cabrera Paez et al., 2008).

Si los individuos analizados hubieran contado con buena condición las relaciones entre IHS, IGS y Ls serían positivas, en tal caso individuos de mayor talla constarían de mejor condición general (Lloret y Planes, 2003; Nimet et al., 2018). Entonces, podríamos interpretar que los valores de IHS en sitios impactados (A y AA) se podrían deber a una respuesta adaptativa frente al estrés ambiental sostenido en el tiempo. Por la elevada y significativa concentración de nitrógeno total, sea por aportes alóctonos como de las mismas excreciones de los organismos, tan elevadas concentraciones generan un estrés sobre el individuo donde el hígado se centra en su función de detoxificación, más que en la de síntesis y reserva energética (Sadekarpawar y Parikh, 2013). Este tipo de adaptaciones son respuestas funcionales y estructurales ante situaciones de estrés fisiológico y ante algunos estímulos patológicos, durante los cuales se deben realizar ciertas modificaciones que permitan a las células sobrevivir y seguir funcionando (Troncoso et al., 2012; Nimet et al., 2018).

La respuesta adaptativa como el aumento del tamaño de las células (hipertrofia) y de su actividad funcional; un aumento del número de células (hiperplasia); una reducción del tamaño y la actividad metabólica de las células (atrofia); o un cambio del fenotipo de las células (metaplasia) son algunas de las modificaciones que el organismo realiza a favor de la supervivencia. Cuando se elimina el estrés, las células podrán recuperar su estado inicial sin sufrir ninguna secuencia (Kumar et al., 2010). Kühl et al., 2010 plantea que la contaminación orgánica no necesariamente implica un daño sobre el organismo, sino que dentro de ciertos rangos considerables, dependiendo de las especies, puede beneficiar el crecimiento de poblaciones con altos requerimientos nutricionales.

Por su capacidad de bioacumular y teniendo en cuenta que el ingreso de compuestos tóxicos al hígado se hace por medio de la circulación sanguínea, en peces el hígado es el principal órgano indicador del estado del individuo asociado a su ambiente y estado fisiológico (Troncoso et al., 2012) ya que de su funcionamiento depende la actividad de detoxificación. Esto implica que en ambientes estresantes en presencia de compuesto tóxicos sea el hígado este órgano el más afectado (Sadekarpawar y Parikh, 2013). Futuras estrategias de biomonitoreo asociadas a diferentes usos del suelo que incluyan biomarcadores somáticos como los aquí analizados deberían incluir cuantificación de lípidos a nivel muscular y hepático,

ya que los lípidos influyen el potencial reproductivo a través del desarrollo y maduración gonadal (Lloret y Planes, 2003) lo que permitirá trazar la disponibilidad y reserva energética para cada población a lo largo del ciclo de vida de cada especie.

Capítulo III: Análisis del efecto de uso del suelo a nivel individuo

Introducción

Como resultado de actividades antropogénicas, los arroyos contienen mezclas complejas de contaminantes las cuales incluyen compuestos genotóxicos, que causan efectos adversos sobre la salud pública y los ecosistemas acuáticos (Ohe et al., 2004). Cualquier respuesta biológica en el medio ambiente asociada a un contaminante es cuantificada en un organismo bioindicador, cuya respuesta comprende una amplia gama de parámetros tales como hematológica, inmunológica, genotóxica entre otras (Van der Oost et al., 2003). Los organismos como los peces permiten indicar la calidad y sostenibilidad del medio ambiente (Furnus et al., 2014). En este sentido, se pueden considerar como buenos bioindicadores debido a su posición en el cadena trófica y su sensibilidad a bajas concentraciones de sustancias genotóxicas (Van der Oost et al., 2003). A nivel de individuo, en estos organismos existen una variedad de biomarcadores utilizados para la evaluación de ambientes acuáticos, los mismos reflejan efectos sobre la molécula de ADN entre otros y son considerados de gran relevancia por sus implicancias ecológicas (Ramsdorf et al., 2012).

A nivel de individuo la integridad de la molécula de ADN y su funcionalidad ha sido intensamente investigada como respuesta a cambios en las condiciones ambientales (Van der Oost et al., 2003; Forchhammer et al., 2008). Estos biomarcadores consisten en la formación de aductos de ADN, aberraciones cromosómicas, roturas del ADN y frecuencia de formación de micronúcleos, entre otras anomalías nucleares (Bombail et al., 2001). Los marcadores genéticos de exposición y efecto tienen alta relevancia dado que reflejan el daño en el material genético a etapas tempranas de exposición (Hyun-Mi et al., 2006; Fonseca et al., 2011). Dichos biomarcadores son aplicados sobre células sanguíneas, ya que se les consideran el tipo celular más efectivo para la cuantificación de efectos debido a que los peces, sobre todo en sistemas de agua dulce, poseen un volumen mayor de sangre que en los sistemas marinos, haciéndolos un modelo ideal para el biomonitoreo de todo tipo de sistemas (Al-Sabti y Metcalfe, 1995). En este sentido el uso de células sanguíneas de teleosteos es un excelente biomarcador, no solo por su abordaje y precisión, sino por ser un método de no invasivo (Hooftman y de Raat, 1982; Witeska, 2013; Da Silva Correa et al., 2016). Los eritrocitos de los peces son sensibles a diversos impactos ambientales pero según Vosylienė (1999), los parámetros cuantitativos básicos de sangre (por ejemplo, hematocrito, recuento de eritrocitos o concentración de hemoglobina) en los peces tienden a permanecer estables debido a una considerable potencia compensatoria (Witeka, 2013).

Los marcadores moleculares ampliamente utilizados para la evaluación lesiones en el material genético a nivel macro, son la formación de micronúcleos (biomarcador de efecto) y el ensayo cometa (biomarcador de exposición). Los micronúcleos (MN) son masas de cromatina intracitoplasmática separadas del núcleo, las cuales son producidas por un daño o fragmentación del ADN, directamente relacionadas con la segregación cromosómica debido a efectos de daño mutagénico (Scarpato et al., 1990; Rocha et al., 2009).

Las roturas cromosómicas darán lugar a fragmentos cromosómicos acéntricos, que al no disponer de centrómeros no serán incluidos en los núcleos hijos. Estos fragmentos se rodean de membrana nuclear y aparecen en el citoplasma como pequeños núcleos que son visibles al microscopio (Benitez-Leite et al., 2010). La formación de MN requiere que la célula esté en división (Heddle et., 1983; Al-Sabti, 1991; Al-Sabti y Metcalfe, 1995). Sea cual sea el tipo de daño a nivel del ADN, la formación de MN se da durante la división celular manifestándose así de manera clara el daño debido a agentes mutagénicos justo después de un ciclo de división celular. Considerando que los plaguicidas pueden ocasionar daño genético y propiciar la transformación celular, la técnica de MN se utiliza ampliamente dada su alta confiabilidad y bajo costo (Benitez-Leite et al., 2010).

El ensayo cometa se basa en la migración de fragmentos rotos de ADN durante la electroforesis alcalina (Lee y Stenert, 2003). Detecta daños primarios en el ADN tales como rotura de doble y simple hebra, sitios álcali lábiles, daño oxidativo y “*crosslinks*”, por lo que es ampliamente utilizado para evaluar genotoxicidad en células eucariotas (Singh, 2000; Bolognesi et al., 2004). En comparación con métodos citogenéticos clásicos, esta metodología es más ventajosa y no contiene restricciones a nivel celular, dado que no se necesitan células en división para su realización y es altamente sensible (Singh et al., 1988). Dentro de las ventajas se destacan: 1) el daño genotóxico se detecta a nivel celular, 2) la mayoría de las células eucariotas son adecuadas para efectuar el ensayo ya que no es necesario que la célula se encuentre en división y 3) solo son necesarias un número pequeño de células y en general es muy fácil de llevar a cabo y más sensible que otros métodos para la estimación del daño a nivel del ADN (Frenzilli et al., 2009).

Un indicador de crecimiento a nivel de molecular es la relación ARN/ADN (Buckley, 1984; Peck et al., 2003; Chicharo y Chicharo, 2008). Este índice se basa en que el contenido de ADN es estable e indicativo del número de células o del crecimiento por proliferación celular (Clemmesen, 1988;1993; Clemmesen et al., 1997) y es comúnmente utilizado en estudios de biomonitorio como indicador del estado fisiológico y del crecimiento en peces, tanto en condiciones controladas como ensayos de laboratorio o en el campo (Clemmesen, 1988). Existe una fuerte relación entre el ARN y la tasa de crecimiento celular, estando esta directamente asociada a los cambios en el ambiente, por lo que la relación ARN/ADN refleja el estado del metabolismo celular y se emplea como una medida de la tasa de crecimiento y de la condición nutricional de los individuos (Buckley, 1984; Clemmesen, 1993; Bergeron, 1997; Caldarone et al., 2003; Clemmesen, 2003; Gilliers et al., 2006; Buckley et al., 2008; Chicharo y Chicharo, 2008; Frommel y Clemmesen, 2009). La concentración de ARN en el músculo se relaciona directamente con la tasa de crecimiento, cuantificada como cambios en el tamaño del pez (Price, 1952; Pepin et al., 1999; Phelan et al., 2000; Kuropat et al, 2002; Caldarone, et al. 2003; Fonseca et al., 2011; Mewes et al., 2017). De esta manera dicha relación es utilizada como herramienta para determinar el grado de perturbación en los organismos causado por la presencia de diferentes tóxicos en el ambiente y reviste gran utilidad para evaluar áreas afectadas por la presencia de contaminantes, tanto orgánicos como inorgánicos (Wo y Wu, 1999; Wang, 2002).

Los biomarcadores mencionados proveen de una medida temporal y espacial integrada de contaminantes biodisponibles y tienen el potencial de indicar cambios que ocurren en el ecosistema en instancias tempranas, por lo tanto permiten la iniciación de estrategias de bioremediación antes de que ocurran daños más serios (Bolognesi y Fenech, 2012).

Objetivo general

Evaluar el impacto de los diferentes usos del suelo sobre la calidad del agua en arroyos en instancias tempranas mediante el uso biomarcadores moleculares sobre tejido el muscular y las células sanguíneas de especies centinelas.

Objetivos específicos

- Analizar el efecto de los usos del suelo sobre el ADN en eritrocitos de dos especies centinelas de peces representativas de los sistemas acuáticos mediante el test de micronúcleos y ensayo cometa como biomarcadores de alerta temprana.
- Determinar el estado metabólico de las poblaciones de peces asociadas a los usos del suelo mediante la relación ARN/ADN como biomarcador a partir de muestras de músculo.

Hipótesis

El efecto de los diferentes usos del suelo sobre la calidad de agua en arroyos se evidencia a nivel de individuo mediante daño en la molécula de ADN.

Predicciones

- I-En arroyos con menor calidad de agua el daño a nivel del ADN, lo que se asocia con arroyos impactados.
- II-Por sus diferencias en hábitos y tipo de alimentación las especies centinelas mostraran sensibilidad diferencial para los biomarcadores moleculares.

Materiales y Métodos

A partir de los resultados obtenidos en el análisis comunitario y la elección de especies centinelas en el análisis poblacional, se seleccionaron 8 diferentes arroyos de acuerdo a los grupos de usos del suelo previamente determinados y se trabajó a nivel de individuo. El manejo de ejemplares vivos a campo se realizó de acuerdo al protocolo de manejo de peces para biomonitoreo n°170 aprobado por la comisión de ética en el uso de animales (CEUA) en febrero de 2016.

Área de estudio y colecta de muestras

Los arroyos seleccionados fueron el arroyo Curupí, Tupambaé e Insaurreal entre los ganaderos (G), Sauce de Berna y Duran entre los agrícolas (A) y los arroyos Pando, Vejigas chico y Negro Paciencia entre los agrícolas-ganaderos (AA). El arroyo Curupí se consideró prístino y se tomó como sitio de referencia.

El muestreo y colecta de muestras se llevó a cabo durante marzo del año 2018. En cada arroyo se registraron parámetros fisicoquímicos del agua mediante sonda multiparametro YSI 6600 en campo y se colectaron muestras de agua para la cuantificación de nutrientes posterior en el laboratorio del departamento de Ecología y Gestión Ambiental, Centro Universitario de la Región Este (CURE). Se cuantificó nitrógeno total (Koroleff, 1970) y fósforo total (Valderrama, 1981).

Mediante la metodología de pesca eléctrica descrita para el análisis comunitario (Teixeira de Mello et al., 2014) en los 8 arroyos se colectaron de 15 a 20 individuos de las especies centinela. Una vez colectados los individuos fueron separados por especies y mantenidos vivos en tarrinas con agua hasta su eutanasia. Todos los individuos fueron sacrificados mediante sobre dosis de eugenol diluido 1:10 en alcohol y posterior dislocación cervical al momento de colectar la muestra de sangre. Previo a la extracción de sangre de cada individuo se registró el largo estándar Ls (cm) y el peso total Pt (g). La extracción se realizó mediante jeringa heparinizada y posteriormente se colectó muestra de músculo. Las muestras de sangre se conservaron a temperatura ambiente en la oscuridad hasta su procesamiento en el laboratorio y las muestras de músculo se conservaron en RNA *later* para evitar la degradación de los ácidos nucleicos, en frío hasta su procesamiento.

Procesamiento y análisis de muestras

***Células sanguíneas: eritrocitos de sangre periférica.**

Ensayo de Micronucleos (MN): A partir de sangre heparinizada periférica extraída a campo, se realizó el extendido de una gota de sangre *in situ* de cada uno de los individuos colectados, por duplicado, sobre portaobjeto (slide) previamente rotulado. El extendido se dejó secar a temperatura ambiente en la oscuridad, luego se fijó en metanol por 10 minutos. Una vez secos guardaron en cajas portaslides hasta su tinción con naranja de acridina para su análisis.

Análisis de slides: se observaron en microscopio de epifluorescencia ZEISS a 100x y se contaron 1000 células por slides, siendo un total de 2000 células por individuo.

La identificación de MN se realizó según los siguientes criterios: 1) el tamaño del MN es menor al tercio del tamaño del núcleo principal; 2) el MN no se solapa con el núcleo principal y sus bordes son distinguibles y su membrana debe estar perfectamente definida y 3) el MN debe tener la misma coloración e intensidad de tinción que el núcleo principal. Se registró la frecuencia de ocurrencia de MN por slide para cada individuo por duplicado y se fotografiaron las células mediante software ISIS, MetaSystems GmbH y se editaron las imágenes obtenidas en software Imagen J FIJI 1.46 (Schindelin et al., 2012).

Ensayo Cometa: A partir de las muestras de sangre heparinizada y dentro de las 24 hs siguientes a la extracción se procedió a la realización del ensayo. Previo a la realización del ensayo se procedió a desarrollar el test de viabilidad celular de las muestras. Para el mismo se procedió de la siguiente forma: se tomaron 100 ul de suspensión celular, se la coloco en portaobjeto y se agregó 1 ul de solución de bromuro de etidio y naranja de acridina de igual volumen, se coloco cubreobjetos e incubó 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

Análisis de slides: se observaron las slides en microscopio de epifluorecencia (Olimpus Flowview, filtro adecuado 503-530 / 640 nm) y se contaron 100 células por slide. Se registró el porcentaje de viabilidad por especie para cada sitio. El análisis de imagen se realizó mediante software Image Pro Plus (Media Cybernetics, USA). El ensayo cometa se realizó según Speit y Hartmann (2005), de la siguiente manera: se sembraron sobre portaobjeto, 100ul de agarosa de bajo punto de fusión junto con 5 ul de la muestra por duplicado para cada individuo, homogeneizando la muestra previo a la siembra. Posteriormente se colocó un cubre por portaobjeto y se llevaron a -4°C por 20 minutos. Luego de cumplido el tiempo de solidificación se quitaron los cubres cuidadosamente sin despegar la agarosa del portaobjeto y se coloraron en *copling* con buffer de lisis, previamente enfriados, por 3 horas a -4°C. Luego se realizó la corrida electroforética en condiciones de frio y oscuridad. La misma consistió en: 20 minutos de *unwinding* previos, temperatura 4°C, voltaje 24v, amperaje 300mA por 25 minutos. Cada corrida se realizó por especie utilizando un individuo de la misma especie perteneciente al arroyo Curupí (sitio prístino), como control negativo. Las condiciones específicas de corrida fueron puestas a punto mediante ensayos de ajustes previos para cada una de las especies centinela. Posteriormente a la corrida se realizaron las neutralizaciones y fijación en la oscuridad y a temperatura ambiente. Cada portaobjeto fue deshidratado con etanol absoluto, se dejó secar en la oscuridad y a temperatura ambiente. Se guardaron en cajas portaslides hasta su posterior tinción y análisis.

Análisis de slides: se tiñeron al momento del análisis las *slides* con naranja de acridina. Se analizaron en microscopio de epifluorecencia Zeiss, un total de 100 nucleoides al azar por individuo (50 por *slide*).

Análisis de imágenes: los cometas se midieron y analizaron mediante software Comet imagen (MetaSystems, Altlubheim, Alemania) en el Laboratorio de Epigenética e Inestabilidad Genómica del Instituto Clemente Estable. Se registraron los parámetros de largo de cola (TL), momento de cola (TM), momento de cola olive (TMO) y porcentaje de ADN (% ADN).

* Muestras de músculo

Índice ARN/ADN: a partir de las muestras de músculo conservadas en RNA *later* se realizó la cuantificación fluorométrica de ácidos nucleicos.

Mediante la utilización del fluorómetro Qubit 2.0 ® se procedió a la cuantificación de ácido ribonucleico (ARN) y ácido desoxirribonucleico (ADN) de la siguiente manera: se calibró la curva para ARN y ADN con los reactivos y estándar de cada kit correspondiente; una vez calibrado el equipo se procedió a la formulación de la solución de trabajo: 1ul de ARN/ADN + 199 ul buffer contenido en el *kit*. Para la extracción de ácidos nucleicos: se pesó 0,05 g de tejido y se colocó en tubo ependorff con 200ul de buffer TR-sacrosil y se

disgregó el mismo mecánicamente en área y material estéril. Posteriormente se mezclaron e incubaron las muestras a temperatura ambiente por 2 minutos en oscuridad.

Cuantificación: en tubos aptos para el fluorómetro se colocaron 180 ul de solución de trabajo + 20 ul de la extracción y se procedió a medir su absorbancia en el equipo. Luego de registrados los valores por individuo para cada ácido nucleico por separado se calculó el cociente para cada uno.

* Relación largo-peso

Con los valores registrados de largo estándar (Ls) y el peso total (Pt), se calculó la relación largo – peso según la ecuación $Pt=aLs^b$ (Ricker, 1973) previa logaritmización de los datos, mediante el ajuste del modelo lineal bivalente propuesto por Warton et al. (2006). La significancia del coeficiente de correlación (r) y la pendiente (b) del modelo, se analizó mediante el test de Student (Zar, 2010). Se calculó el factor de condición relativo (Kr) (Froese, 2006) para cada individuo. ($Kr = Pt/Pe$ (Pt = peso total del individuo; Pe = peso estimado a partir de la ecuación $Pt=aLs^b$)). Se analizó la relación entre el factor de condición (Kr) y el largo estándar (Ls)

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante métodos no paramétricos a excepción de los datos de nutrientes para los cuales se evaluaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza mediante test de Shapiro-Wilk y Levene (Zar, 2010), respectivamente. Todos los análisis se realizaron en Past program 3.21 (Hammer, et al., 2001). El nivel de significancia utilizado para todos los casos fue de $p=0,05$.

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) (Davis, 1986; Harper, 1999) entre los usos del suelo de acuerdo a los datos fisicoquímicos y nutrientes totales en agua, utilizando la matriz de correlaciones.

Mediante análisis de varianza (ANOVA) se analizó si no existen diferencias entre las concentraciones de nutrientes para los arroyos considerados.

Mediante el coeficiente de correlación no – paramétrico de Spearman (Zar, 2010) se analizaron las diferentes relaciones entre los biomarcadores somáticos evaluados.

Mediante el análisis multivariado de la varianza no paramétrico (NPMANOVA) (Anderson, 2001) usando el coeficiente de correlación, se analizó el grado de diferenciación de los grupos de sitios según los usos del suelo, para los tres biomarcadores moleculares.

Resultados

En los 8 arroyos seleccionados se colectaron un total de 201 individuos dentro de los cuales 96 pertenecieron a *B. iheringii* (Bi) y 105 a *G. terrapurpura* (Gt). Las características fisicoquímicas relevadas a campo en cada uno de los sitios mostraron valores de temperatura del agua entre 16°C y 24,6°C, sin diferencias significativas entre sitios ($H_c=0.6944$, $p= 0.7066$), los valores de pH fueron cercanos a 7, la conductividad varió de 175 us/cm en el arroyo Tupambaé a 907 us/cm en el arroyo Pando. En cuanto al oxígeno disuelto en agua (OD), Tupambaé mostró valores cercanos a cero, indetectables por el multiparametro y el valor máximo fue de 12,3 mg/l en el arroyo Insaurreal. La concentración de fósforo y nitrógeno total medidos en el laboratorio no mostró diferencias significativas entre los usos del suelo ($H_c = 0,894$, $p= 0,344$). El fósforo total (PT) varió entre 29,7 ug/l en el arroyo Tupambaé y 513,084 ug/l en el arroyo Pando, por su parte el nitrógeno total (NT) en el arroyo Curupí fue de 67,8734 ug/l siendo la concentración más baja y en al arroyo Sauce de Berna fue de 930,8 ug/l siendo este el valor más alto del conjunto de sitios muestreados (tabla 3.1).

Tabla 3.1. Parámetros fisicoquímicos y concentración de nutrientes por sitio de muestreo según usos del suelo (G: ganadero, A: agrícola; AA: agrícola -ganadero) (OD: oxígeno disuelto, PT: fósforo total, NT: nitrógeno total).

Uso del suelo	Arroyo	Hora	Temperatura (°C)	pH	Conductividad (us/cm)	OD (mg/L)	PT ug/L	NT ug/L
G	Curupí	11:10	24,6	7,71	555	5,77	39,039	67,8734
	Tupamabé	8:55	16,08	6,82	175	0	29,7	101,8
	Insaurreal	10:00	17,65	7,44	457	12,3	39,039	174,5316
A	Sauce de Berna	13:15	21,67	7,81	672	7,52	734,305	930,8352
	Duran	17:45	19,06	7,72	831	2,9	197,054	329,6708
AA	Pando	16:00	23,63	7,92	907	4,34	513,084	872,658
	Vejigas Chico	13:15	20,76	6,99	417	7,42	215,6	305,4
	Negro Paciencia	16:00	20,23	6,85	642	8,07	159,9	97,0

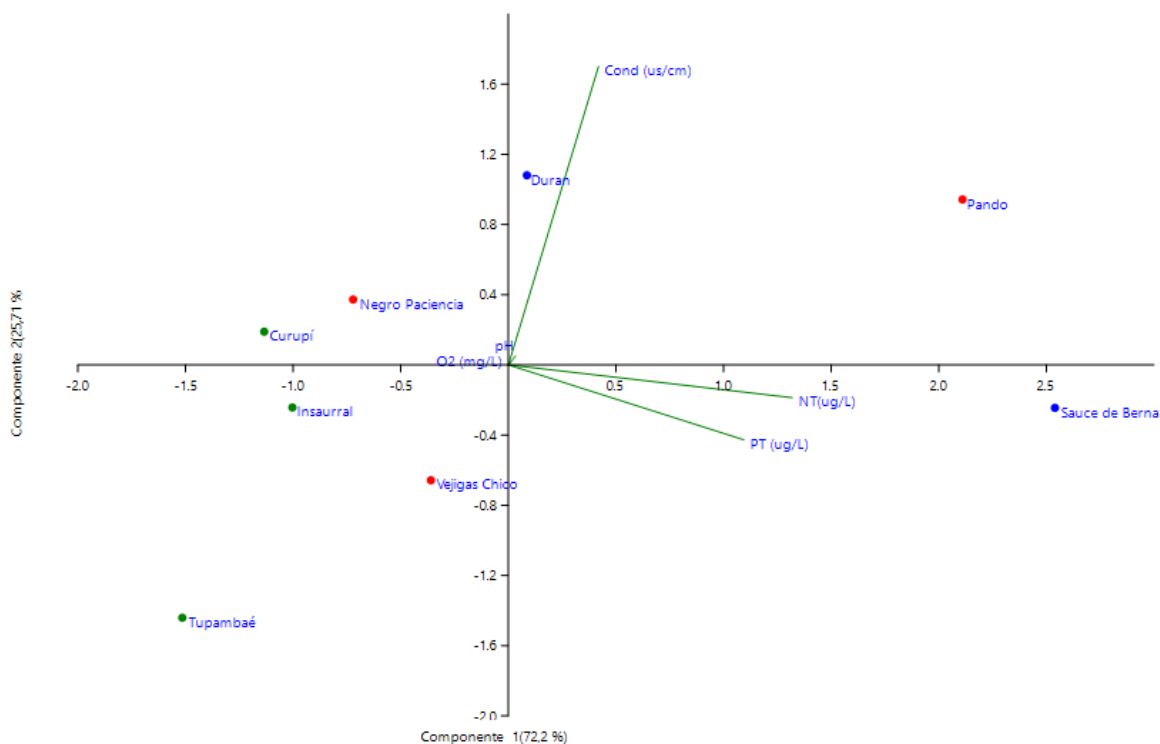


Figura 3.1. Resultado análisis de componentes principales (ACP) para los arroyos muestreados para los marcadores moleculares entre los parámetros fisicoquímicos del agua relevados a campo (Cond: conductividad; OD: oxígeno disuelto; pH) y la concentración total de fósforo y nitrógeno total. (PT: fósforo total, NT: nitrógeno total), (verde: G, Azul A; rojo: AA),

Los primeros dos factores del análisis de componentes principales (ACP) explicaron más del 95 % de la variabilidad (figura 3.1). Todos los parámetros se correlacionaron de manera positiva con el componente 1 el cual explicó el 72,2 % de la variabilidad total. La componente 2 explicó el 25,71 % de la variabilidad total, el PT y NT se correlacionaron de manera negativa, a diferencia del pH, la conductividad y el oxígeno disuelto que lo hicieron de manera positiva. Los tres arroyos agrupados en G se ubicaron en los cuadrantes de la izquierda de manera conjunta, los agrupados en AA se ubicaron en el cuadrante izquierdo también, a excepción del arroyo Pando, el cual se ubicó en el cuadrante superior derecho, junto con el arroyo Duran perteneciente a A. En este último caso, los arroyos aquí situados se caracterizaron por una elevada conductividad en comparación con el resto. Por último, el arroyo Sauce de Berna se ubicó en el cuadrante inferior derecho.

El test de micronucleos (MN) mostró diferencias significativas para la frecuencia de ocurrencia (FO) entre especies según los usos del suelo ($Hc_{FO}=75,58$, $p=7,02 \times 10^{-15}$). Para Bi, en los arroyos agrupados en G, fueron significativamente diferentes a los arroyos agrupados en A y AA y para Gt los arroyos agrupados en G, fueron significativamente diferentes a los arroyos agrupados en A y AA. Para ambas especies, se observó una tendencia creciente en el sentido G, A, AA (Figura 3.2). Es de destacar que las células observadas de Gt pertenecientes al arroyo Pando mostraron mayor número de citocinesis celular por *slide* en comparación de Bi en el mismo sitio (figura 3.2). Solo se registró un solo MN por célula (figura 3.3)

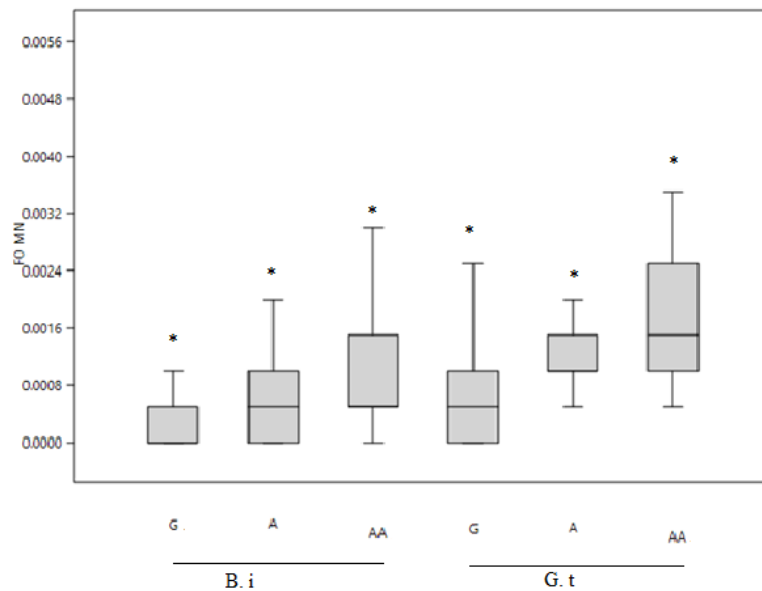


Figura 3.2. Frecuencia de ocurrencia de micronúcleos (FO MN) para *B. iheringii* (B. i) y *G. terrapurplea* (G. t), según los usos del suelo (G: ganadero, A: agrícola; AA: agrícola-ganadero). (* Valores significativos <0,05)

Para el ensayo cometa (CA), previo a la siembra y corrida electroforética, se analizó la viabilidad celular para cada conjunto de muestras. De un total de 1000 células contabilizadas, la viabilidad celular fue mayor al 90% para cada especie por sitio de muestreo. De los parámetros registrados por el *software* utilizado, *tail moment olive* (TMO) fue el seleccionado para el análisis ya que el mismo resulta de la diferencia entre la distancia media de cola y cabeza y el % de ADN en la cola, se mide en unidades arbitrarias (UA). Los resultados del CA mostraron diferencias significativas entre especies, observándose mayor nivel de daño en Bi en comparación a Gt ($H_{c\ TMO} = 204,2$, $p = 3,66 \times 10^{-42}$). En este sentido en los arroyos agrupados en G para Gt no se observaron cometas en el total de células analizadas (figura 3.4).

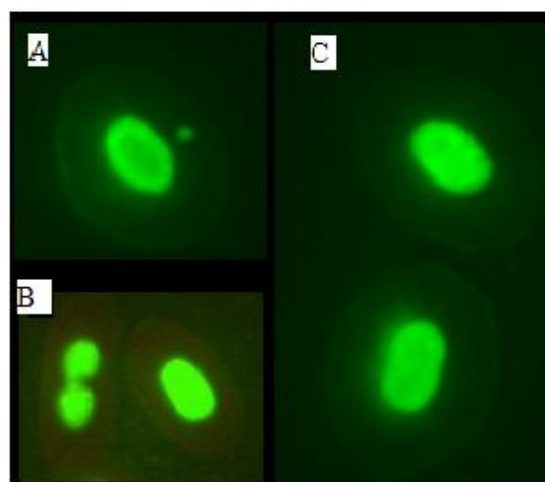


Figura 3.3. Eritrocitos de *B. iheringii* y *G. terrapurplea* en microscopio de epifluorescencia, 100X tensión naranja de acridina, filtro 470nm. **A:** MN, **B:** citocinesis y célula sana G. t arroyo Pando, **C:** células sanas, B. i sup, G. t inf.

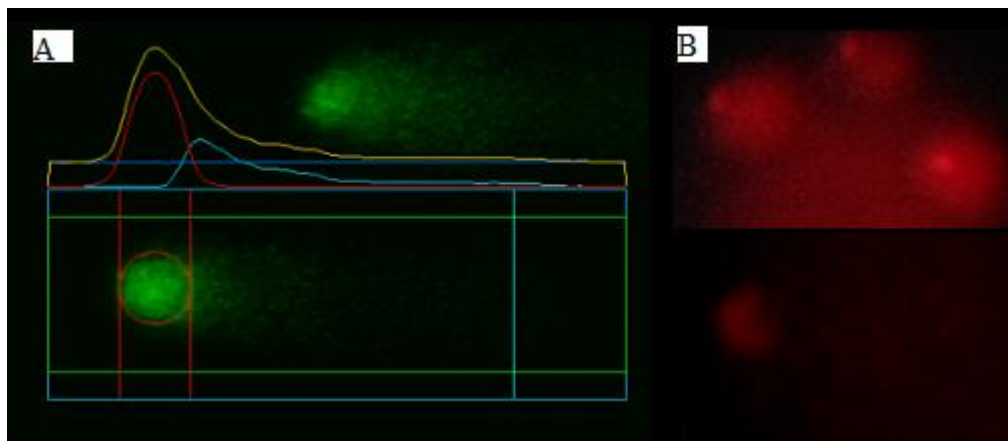


Figura 3.4. Eritrocitos luego de corrida electroforética. Vista 63x , tinción naranja de acridina, filtro 470 nm. (A: cuantificación de daño en software, círculo rojo corresponde a la cabeza, la cola se encuentra delimitada en el rectángulo verde. B: cometa *B. iheringii* arroyo Pando sup., cometa *G. terrapurplea* arroyo Pando inf.).

Se encontraron diferencias significativas entre los individuos de Bi agrupados en G con los agrupados en A y en AA y con los individuos de Gt agrupados en G, A, y AA. Los mayores valores de TMO se observaron en Bi. Dentro de los individuos pertenecientes a Bi los valores de TMO variaron entre 214,9 UA y 1,09 UA en los arroyos agrupados en AA y G respectivamente. Para los individuos Gt los valores fueron inferiores, observándose el valor máximo de 95, 27 UA en los arroyos agrupados en A y el menor valor fue de 3,7 UA en los arroyos agrupados en AA (figura 3.5).

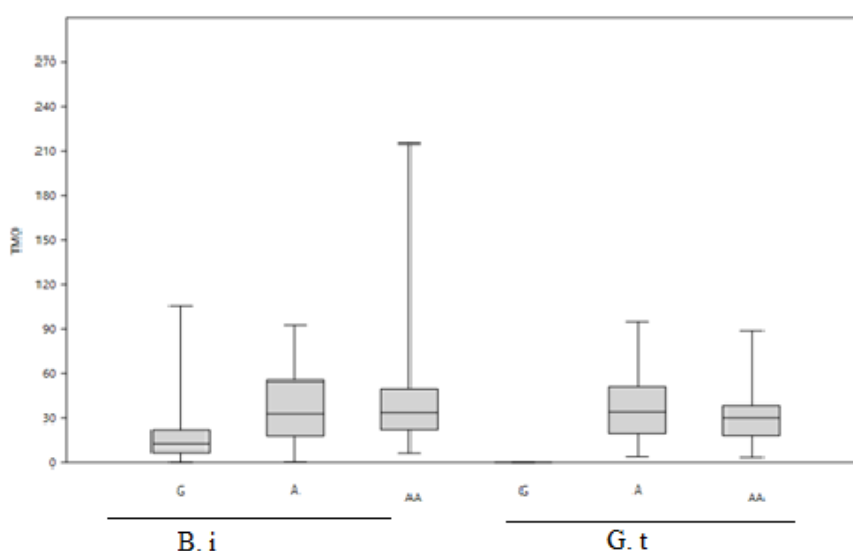


Figura 3.5. Resultado del ensayo cometa. Variación del *tail moment olive* (TMO) para *B. iheringii* (B. i) y *G. terrapurplea* (G. t), según los usos del suelo (G: ganadero, A: agrícola ; AA: agrícola-ganadero).

El índice ARN/ADN (R/D) para ambas especies mostró un comportamiento similar, observándose una marcada disminución del mismo en los arroyos Tupambaé y Durán (figura 3.6). La concentración de ADN para ambas especies no mostró diferencias significativas, a diferencia de la concentración de ARN el cual fue significativamente menor en Bi ($H_c_{ARN}=6,893$ $p= 0,00865$). Se encontraron diferencias

significativas entre los usos del suelo para Gt ($H_{c\ R/D} = 41,82\ p= 8,306$) y estas diferencias fueron entre AA y el resto ($G\ p= 1,28 \times 10^{-6}$, $A\ p= 3,61 \times 10^{-8}$)(tabla 3.2, figura 3.7), con una tendencia creciente en el sentido G, A AA (Figura 3.7).

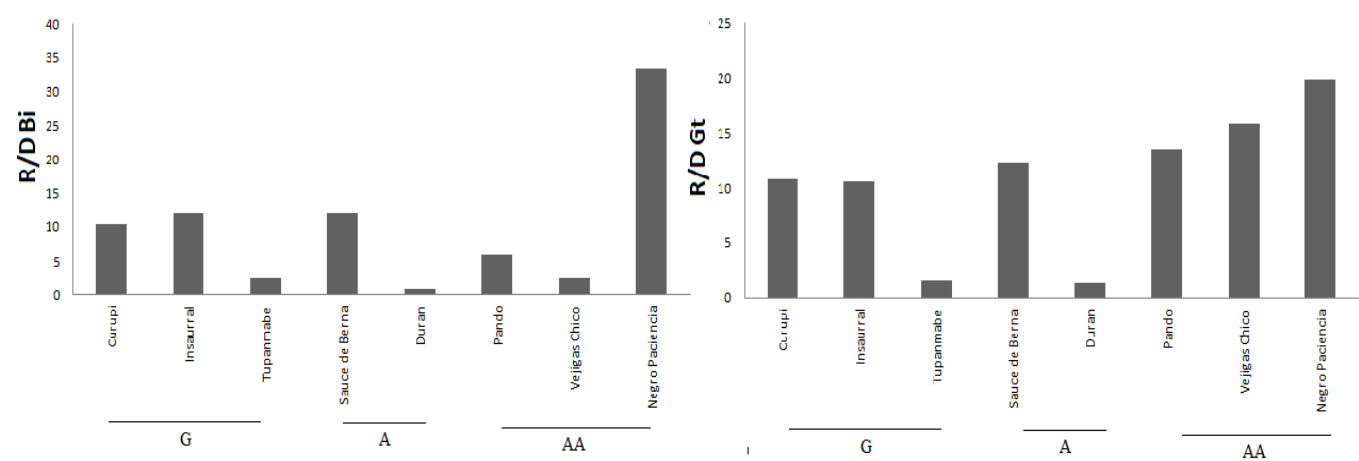


Figura 3.6. Valores del índice ARN/ADN (R/D) para *B. iheringii* (Bi) y *G. terrapurpura* (Gt) en cada arroyo muestreado; G: ganadero, A: agrícola; AA: agrícola-ganadero).

Tabla 3.2. Variación de la concentración de ácidos nucleicos (ADN, ARN) (ug/mL) para *B. iheringii* (Bi) y *G. terrapurpura* (Gt), según los usos del suelo)(G: ganadero, A: agrícola ; AA: agrícola-ganadero)

	G		A		AA	
	ADN	ARN	ADN	ARN	ADN	ARN
BI	0,269± 0,14	2,137± 1,47	0,345 ±0,15	2,276 ± 1,30	0,332 ± 0,18	2,950 ± 2,14
Gt	0,382 ± 0,23	2,987 ± 2,22	0,311 ± 0,07	2,376 ± 2,00	0,347 ± 0,06	5,513* ± 0,84

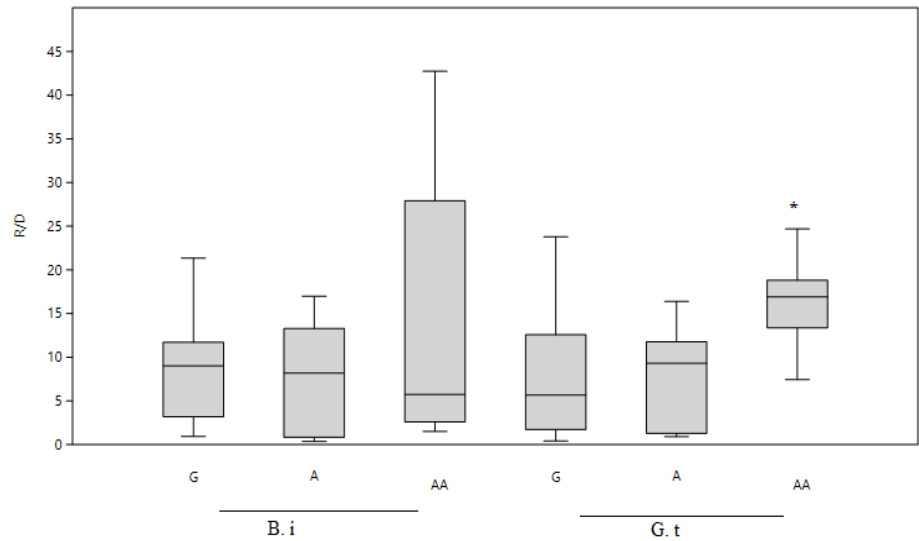


Figura 3.7. Variación del índice ARN/ADN (R/D) según los usos del suelo para *B. iheringii* (B. i) y *G. terrapurpura* (G. t). G: ganadero, A: agrícola ; AA: agrícola-ganadero). (* Valores significativos <0,05)

La relación largo-peso total y largo-peso eviscerado para cada individuo por arroyo se ajustó al modelo de regresión potencial. El coeficiente de correlación (r) y la pendiente (b) fueron significativos, tanto para el peso total como eviscerado (tabla 3.3). El valor de b para cada especie, según los usos del suelo, mostró valores cercanos a 3, observándose el máximo valor para Bi en el arroyo Vejigas Chico perteneciente a AA. Ninguno de los valores de b fue significativamente diferente de 3, por lo que no se puede concluir la existencia de crecimiento estadísticamente diferente al isométrico (b=3). La relación de tallas (Ls) y peso total (Pt) de los individuos analizados no mostraron diferencias significativas entre especies para los usos del suelo. Las tallas y pesos máximos se observaron en los arroyos agrupados en G para Bi y para Gt en los arroyos agrupados en AA, los pesos y tallas mínimas para ambas especies se observaron en los arroyos agrupados en A. Para Bi la talla varió entre 7,5 cm en el arroyo Curupí y 3,7 cm en el Durán y el peso lo hizo entre 8,7 g en el Insaurral y 1,2 g en el Durán también. Para Gt la talla varió entre 9,0 cm y 3,3 cm, observándose el máximo en los arroyos AA y el mínimo en el arroyo Sauce de Berna. El peso total máximo fue de 27,3 g en el arroyo Vejigas Chico y el valor más pequeño fue de 1,4 g en el arroyo Sauce de Berna (tabla 3.4).

Tabla 3.3. Resultados de la relación largo-peso, para los individuos utilizados para el análisis de biomarcadores moleculares. (Bi: *B. iheringii*; Gt: *G. terrapurple*). (Tipo de crecimiento: b=3 isométrico, b<3 alométrico negativo, b>3 alométrico positivo). *Significativos para test de Student (p<0,05). (a: valor del intercepto; b: valor pendiente, r: coeficiente de correlación, r2: coeficiente de determinación); (G: ganadero, A: agrícola; AA: agrícola –ganadero).

Uso del suelo	Arroyo	Bi					Gt				
		N	a	b	r	r2	N	a	b	r	r2
G	Curupí	13					15				
	Insaurral	15	0,021	3,058	0,911 *	0,892	15	0,058	2,769	0,953*	0,910
	Tupambae	15	0,019	3,073	0,947*	0,898	15	0,045	2,884	0,983*	0,968
A	Sauce de Berna	15	0,032	2,810	0,969*	0,941	10	0,036	3,051	0,997*	0,996
	Duran	10	0,035	2,794	0,974*	0,950	9	0,034	3,057	0,998*	0,997
AA	Pando	10					15				
	Vejigas Chico	10	0,012	3,490	0,951*	0,901	11	0,039	2,947	0,979*	0,959
	Negro Paciencia	8	0,023	3,028	0,995*	0,990	15	0,046	2,888	0,997*	0,994
Uso del suelo	Arroyo	Peso eviscerado									
		N	a	b	r	r2	N	a	b	r	r2
G	Curupí	13					15				
	Insaurral	15	0,029	2,831	0,908*	0,826	15	0,064	2,682	0,945*	0,894
	Tupambae	15	0,012	3,252	0,947*	0,897	15	0,021	3,215	0,983*	0,967
A	Sauce de Berna	15	0,032	2,760	0,966*	0,934	10	0,029	3,130	0,997*	0,996
	Duran	10	0,014	3,313	0,994*	0,988	9	0,031	3,070	0,997*	0,995
AA	Pando										
	Vejigas Chico	10	0,002	4,338	0,971*	0,942	11	0,029	3,020	0,963*	0,928
	Negro Paciencia	8	0,012	3,338	0,998*	0,997	15	0,029	3,091	0,997*	0,995

Tabla 3.4. Estructura de tallas (Ls) y peso total (Pt) de las especies centinelas (Bi: *B. iheringii*; Gt: *G. terrapurpura*). N: número total de individuos, Ls: largo estándar, Pt: peso total. (G: ganadero, A: agrícola ; AA: agrícola-ganadero).

Uso del suelo	Arroyo	Bi					Gt				
		N	Ls(cm)		Pt (g)		N	Ls(cm)		Pt (g)	
			max	min	max	min		max	min	max	min
G	Curupí	13	7,5	4,8			15	7,8	4,8		
	Tupamabé	15	5,0	5,0	8,7	3,1	15	7,5	5,0	16,7	5,7
	Insaurreal	15	7,0	5,58	8,2	3,1	15	8,8	5,4	22,6	5,8
A	Sauce de Berna	15	6,5	5,0	7,4	2,7	10	8,4	3,3	22,5	1,4
	Duran	10	5,2	3,7	3,3	1,2	9	8,0	4,0	20,4	2,3
AA	Pando	10	6,5	4,5			15	9,0	5,0		
	Vejigas Chico	10	5,4	4,0	3,9	1,6	11	9,0	4,2	27,3	3
	Negro Paciencia	8	6,8	4,0	7,6	1,7	15	9,0	4,0	26,6	2,7

En los arroyos Curupí y Pando no se calculó el factor de condición relativo (Kr) ya que no se registraron los valores de peso para ambas especies. De acuerdo a los usos del suelo Kr no mostró diferencias significativas para ninguna de las dos especies. Los valores de Kr oscilaron entre 1,2 y 0,80 para ambas especies, mostrando su valor máximo en los arroyos agrupados en AA para ambas especies (figura 3.8).

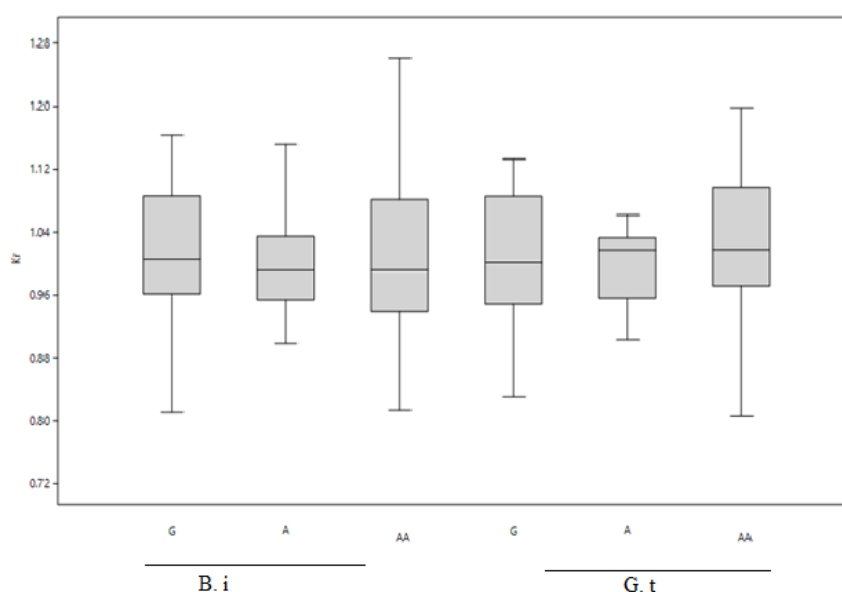


Figura 3.8. Factor de condición relativo (Kr) para *B. iheringii* (B.i) y *G. terrapurpura* (G. t) según los usos del suelo (G: ganadero, A: agrícola; AA: agrícola-ganadero).

El NPMANOVA para los marcadores moleculares MN, CA y R/D entre los diferentes usos del suelo mostró diferencias significativas para ambas especies: Bi ($F=1,659$, $p= 0,0025$) y Gt ($F=27,75$, $p= 0,0001$). Estas diferencias fueron entre G – A ($p= 0,01$) y G – AA ($p= 0,02$) y entre todos los usos ($p=0,0003$) para Bi y Gt, respectivamente. Para Bi, la correlación entre R/D y MN fue negativa y significativa para los arroyos agrupados en G, la correlación entre R/D y CA fue positivo y significativo en los sitios A y la correlación de MN y CA fue significativamente negativa para los arroyos agrupados en G (Tabla 3.5). Para Gt se encontraron correlaciones positivas y significativas para los arroyos agrupados en A y AA (tabla 3.5).

Tabla 3.5. Resultados del coeficiente de correlación de Spearman entre el test de micronucleos (MN), ensayo cometa (CA) e índice ARN/ADN(R/D) por especie según los usos del suelo (Bi: *B. iheringii*, Gt: *G. terrapurpura*) (G: ganadero, A: agrícola; AA: agrícola -ganadero). (rs: estadístico de Spearman, p: valor asociado). * Valores significativos <0,05)

Bi	R/D-MN			R/D-CA		MN-CA	
	N	rs	p	rs	p	rs	p
G	43	-0,400	0,008*	0,3129	0,040*	-0,321	0,037 *
A	25	-0,224	0,271	0,768	7,24X 10⁻⁶ *	0,216	0,300
AA	28	-0,097	0,64	0,196	0,316	0,071	0,718
Gt	R/D-MN			R/D-CA		MN-CA	
	N	rs	p	rs	p	rs	p
G	45	-0,102	0,472	N/A		N/A	
A	19	-0,028	0,900	0,810	2,57X10⁻⁵ *	0,266	0,267
AA	41	-0,061	0,710	0,630	8,30X10⁻⁶ *	0,204	0,198

Discusión

Los resultados para todos los marcadores moleculares aquí analizados mostraron un marcado gradiente diferencial para ambas especies centinelas *B. iheringii* (Bi) y *G. terrapurpura* (Gt), asociado al nivel de impacto ambiental correlacionado directamente con los usos del suelo. El análisis de componentes principales (ACP) entre los parámetros fisicoquímicos y la concentración total de nitrógeno (NT) y fósforo (PT) agrupó a los arroyos identificados como de menor impacto (G) juntos en cuadrantes con la menor concentración de nutrientes, ubicándose allí el arroyo Curupí, elegido como control negativo para los ensayos.

Dado que los micronúcleos (MN) son indicadores directos de daño cromosómico el cual se origina durante la división celular (Mudry y Carballo, 2006) y si bien en el caso de peces la frecuencia de ocurrencia de MN basal es normalmente muy baja (Gustavino et al., 2001; Ferraro et al., 2004), los resultados obtenidos mostraron la existencia de daño cromosómico con una marcada diferencia significativa entre las especies centinelas analizadas. Este tipo de daño confirma la presencia de agentes genotóxicos en el agua. De las dos especies centinelas Gt mostró mayor FO de MN que Bi, sobre todo en arroyos agrupados en AA, considerados más impactados. Siendo un test de efecto a exposición crónica, sean los daños clastogenicos (quiebre de cromosomas) o aneugénicos (pérdida de cromosomas), la diferencia de frecuencia de ocurrencia de MN entre ambas especies se asoció a sus diferentes hábitos tróficos y características fisiológicas. Dicha diferencia, a nivel metabólico, caracteriza a Gt como más activa ya que para este test es necesaria la proliferación celular. Por otra parte, es de destacar que durante el análisis de *slides* esta especie mostró una elevada presencia de citocinesis celular, sobre todo en el arroyo Pando, reforzando así lo antes mencionado.

Para ambas especies en los arroyos agrupados en G, la FO de MN fue menor y existió una significativa diferencia entre sitios asociados a los usos del suelo. Las diferencias en la FO de MN en Gt se

asocia a sus hábitos alimenticios, ya que al alimentarse sobre la columna de agua y el fondo maximiza su exposición a sustancias tóxicas, favoreciendo la bioacumulación y biomagnificación, tanto provenientes del agua como del sedimento (Hussain et al., 2016). Estas diferencias en frecuencia de MN asociados en los distintos niveles tróficos, concuerdan con lo planteado por otros autores para Uruguay (Villar et al., 2014; Gutiérrez et al., 2015) y la región (Grisolia et al., 2009; Matsumoto et al., 2003; Matsumoto y Marin-Morales, 2004; Certari et al., 2004; Viana et al., 2018). Estos resultados demuestran que diferentes especies pueden responder completamente diferente a contaminantes específicos (Grisolia et al. 2009; Leung et al. 2014; Silva et al. 2015).

La presencia de MN es evidencia de daño causado por contaminantes químicos en el medio ambiente acuático (Bolognesi y Hayashi 2011; Bogoni et al., 2014). Esta característica del aumento de daño tanto clastogénico como aneugénico llevan a la formación de MN (a medida que el nivel trófico aumenta (Matsumoto et al., 2006; Melo et al., 2014). Se han descripto para otras especies situaciones similares, encontrándose mayores concentraciones de contaminantes tales como plomo (Pb), cromo (Cr), mercurio (Hg) en consumidores terciarios como *Cichla* spp y *Serrasalmus* spp, seguido de peces omnívoros (Barbosa et al., 2003; Matsumoto et al., 2003; Certari et al., 2004; Viana et al., 2018). También se han observado niveles similares de daño asociado a contaminantes como pesticidas organoclorados y policlorobiofenilos (PCB), los cuales se acumulan a lo largo de las cadenas alimenticias, llegando a lo más alto con elevadas concentraciones de los mismos en los tejidos de los principales depredadores (Livingstone, 1993; Kelly et al., 2007). Una de las fuentes de aportes alóctonos de metales presentes en agua proviene de la agricultura con el uso de agroquímicos y fertilizantes (Bednarova et al. 2013; Silva et al. 2017). Metales, tales como cromo, cadmio y plomo, se usan como fertilizantes y pesticidas en agricultura (Lopes et al. 2011; Simonato et al. 2016). La bioacumulación y biomagnificación de metales en los tejidos de los peces pueden afectar la integridad del ADN, causando efectos mutagénicos, los cuales afectan la expresión de genes clave en instancias reproductivas y desarrollo de la estructura gonadal en peces (Weisbrod et al., 2007; Diop et al. 2016; Dourado et al. 2016; Gárriz et al. 2018). Nuestros resultados son consistentes con otros estudios que muestran la relación entre los usos del suelo y el aumento de la contaminación junto con un incremento de daño a nivel del ADN en especies de peces (Bianchi et al. 2015; Tabet et al. 2015; Batista et al. 2016; Hemachandra y Pathiratne 2016; Viana et al., 2018).

La electroforesis alcalina en gel unicelular (SCGE), o ensayo del cometa (CA), es un procedimiento rápido, sencillo y sensible para la cuantificación de daño en el ADN en células individuales las cuales no necesitan de la proliferación celular (Tice et al., 2000). La calidad de la muestra, manipulación y conservación de la misma hasta su procesamiento fue la adecuada, siendo la viabilidad celular elevada (Ramsdorf et al., 2009). Dentro de los parámetros medibles en CA el largo de cola (TL) de los cometas está asociado al nivel de daño (Olive et al., 1991), pero al mismo tiempo se encuentra directamente influenciado por la variabilidad en las condiciones de corrida afectando directamente la sensibilidad de detección de daño (Olive y Durand, 2005). Por dicho motivo se seleccionó el momento de la cola de olive (tail moment olive,

TMO) dado que tiene en cuenta el producto entre el porcentaje de ADN en la cola, en relación a la diferencia de distancias entre la mediana de la cabeza y la mediana de la cola, evitando así ruido y sesgo potenciales generados por diferencias de ajuste en la corrida, haciéndolo el parámetro más adecuado para la comparación de nucleoides en una población celular heterogénea tal como en nuestro caso (Olive y Durand, 2005) permitiendo así cuantificar el grado de fragmentación del ADN (O'Callaghan et al., 2001; Wilkins et al., 2002; Olive y Durand, 2005).

De acuerdo a los valores de TMO el daño de mayor frecuencia fue la rotura de ADN, generando tamaños de cola elevados, el cual es potencial iniciador de roturas de doble hebra, (Obe et al., 2002; Van der Oost et al., 2003). Estas son el resultado de inactivaciones y alteraciones en los mecanismos de reparación del ADN (Obe et al., 2002; Matsumoto, 2003; 2004; Ferraro et al., 2004; Cestari et al., 2004). Los valores de TMO para Bi en los arroyos agrupados en AA fueron significativamente más altos que en G y A para la misma especie. Por su parte los valores de TMO para Gt mostraron un comportamiento diferente. En los arroyos agrupados en G, no se encontraron nucleoides y por lo tanto el valor de TMO fue de 0. Esto está en contraposición con lo hallado en el mismo sitio para Bi donde se evidenció cierto nivel de daño con cometas mostrando colas anchas, largas y de silueta difusa con gran porcentaje de ADN en la cola. Este tipo de daño es característico en peces por toxicidad en presencia de metales, herbicidas y algunos insecticidas piretroides, que aun en bajas concentraciones, generan daño a nivel del ADN (Matsumoto, 2003; Ferraro et al., 2004; Certari et al., 2004; Matsumoto et al., 2006; Marinowic et al., 2012; De Souza Filho et al., 2013a; 2013b). Este ensayo de exposición aguda, demuestra que en el momento del muestreo los individuos estaban expuestos a contaminantes con efectos genotóxicos. El nivel de daño encontrado se asoció con los usos del suelo y el gradiente de impacto esperado. Para ambas especies los niveles de daño fueron mayor en los arroyos agrupados en A y AA, ambos involucrando actividades agrícolas, las diferencias halladas en los arroyos agrupados en G se asociaron a descargas de desechos de la agricultura, las cuales causan altos niveles de contaminación a nivel superficial (Ergene et al., 2007b), por lo que los diferentes hábitos alimenticios de las especies centinelas explicarían las diferencias en el daño observado (Romeo et al., 1999; Ergene et al., 2007 b). Similares resultados se han encontrado asociados a la dieta de Bi, compuesta de artrópodos y de larvas como los principales ítems alimentarios, asociados a la ingesta de alimento contaminado con piretroides del tipo β -cifutrina, insecticida poco soluble en agua, inmóvil en sedimento, que se mantiene en la columna de agua con elevados valores para CA y asociados a dosis respuesta (Marinowic et al., (2012).

El índice ARN/ADN (R/D) mostró un comportamiento similar a lo observado en el test de MN. Para Gt, los valores fueron significativamente superiores en los sitios AA en comparación de Bi. Esto muestra una clara actividad metabólica diferencial, no influenciada por la reproducción, ya que el muestreo fue en marzo, fuera de la época reproductiva de ambas especies (Yaffe et al., 2002; Lambert et al., 2004; Loureiro et al., 2016), ni tampoco se podría asociar al crecimiento ya que todos los individuos eran adultos y en etapas tempranas del desarrollo la concentración de ARN esperada sería alta (Gil et al., 2003; Buckley et al., 2008).

En promedio para Gt la concentración de ARN en todos los sitios fue mayor que para Bi. Concentraciones elevadas de ARN están asociadas a la actividad enzimática ya que varían proporcionalmente con la síntesis proteica (Villamarin et al., 2016) y al buen estatus nutricional (Buckley et al., 2008; Laflamme et al., 2012). Esto último no fue posible confirmarlo ya que no se contó con individuos mantenidos en laboratorio ni tampoco el cálculo del factor de condición relativo (Kr) permitió asociarlo a una buena condición. El Kr no mostró diferencias entre arroyos para ninguna de las dos especies y esto se podría deber a que el rango de tamaño fue muy acotado. En este sentido la poca variación del rango de tamaños (Ls) analizado permitió evitar el efecto que tiene el mismo sobre la respuesta de los marcadores moleculares analizados (Fonseca et al., 2011).

Buckley et al. (2008) mostró que la tasa de crecimiento inferida mediante este índice está fuertemente correlacionada con la temperatura del agua. Esto no se correlacionó con nuestros resultados, pero si se pudo observar una fuerte asociación de la disminución de R/D para ambas especies en los arroyos Tupambaé y Duran donde el OD fue menor. Los individuos Bi, en estos arroyos presentaron menor peso, lo que concuerda con lo planteado por Villamarin et al., (2016), para quienes la inversión somática de energía implica directamente una reserva de energética extra y no siempre niveles elevados de nutrientes implican aumento en la tasa de crecimiento y metabólica. La temperatura y las concentraciones de OD en agua estarían afectando directamente el metabolismo de los peces y la falta de oxígeno retarda el desarrollo del individuo (Gil et al., 2003). La dos especies mostraron concentraciones medias de ADN similares, lo que adquiere gran relevancia al momento del análisis de CA, ya que eventos de poliploidía significativos asociados a aberraciones cromosómicas como consecuencia de anomalías mitóticas reportadas en peces de agua dulce, generan cambios en los patrones de migración en la electroforesis (Certari et al., 2004).

La correlación entre todos los marcadores moleculares analizados mostró una relación significativa entre todos ellos. Entre R/D y MN la correlación fue negativa para ambas especies, esto estaría asociado a que los MN manifiestan el efecto de una exposición crónica, sostenida en el tiempo y es necesaria la proliferación celular, del individuo a un componente toxico. El aumento en la frecuencia de MN es el resultado adaptativo a dicha exposición crónica, donde la tasa de división celular se mantienen pero en cada división eventos aneugénicos o clastogenicos generan la perdida de información genética sin posibilidad de reparación , que en generaciones celulares posteriores podría desaparecer para siempre (Grisolia , 2002; Melo et al., 2014). Esta relación negativa, implica cierto compromiso desde el punto de vista metabólico ya que la concentración de ARN varía con la tasa metabólica del tejido analizado y la condición fisiológica del individuo (Herrera-Reveles et al., 2012) al aumentar la frecuencia de ocurrencia de MN disminuye la relación R/D, lo permite inferir menor nivel de síntesis y disminución de la tasa de crecimiento en momentos donde la proliferación celular es activa bajo condiciones de estrés crónico. Por este motivo, la cuantificación de ácidos nucleicos a nivel del hígado y gónadas hubiera permitido realizar una mejor inferencia en referencia al compromiso metabólico aquí planteado y permitiría una mejor aproximación al estado metabólico del individuo en referencia a su ambiente (Villamarin et al., 2016).

La correlación entre MN y CA permitió comparar un marcador de efecto, el cuyo daño no es reversible como el test de MN con otro de exposición como CA, cuyo daño puede ser reparado, mostró correlación positiva en los sitios A y AA para ambas especies. Eso muestra que en el momento del muestreo los individuos estaban expuestos a contaminantes genotóxicos, siendo Gt es la especie tolerante, en comparación a Bi dada la ausencia de cometas en los individuos de sitios G y la correlación negativa en estos sitios para Bi. En los sitios agrupados en A y AA los niveles de daño para ambas especies es elevado a diferencia de lo mostrado por Bi en G, en este último no necesariamente el nivel de daño es menor, sino que la especie responde diferente al nivel de estrés, esto se evidencia en la diferencia significativa mostradas por esta misma especie. Dichos resultados concuerdan con los observados para controles negativos en experimentos de exposición a tóxicos. En los niveles tróficos superiores se observaron un nivel basal de daño cercano a cero al igual que lo reportado para otras especies (Certari et al., 2004; Ferraro et al., 2004). La correlación entre ambos marcadores de exposición aguda (R/D y CA) mostró una clara y significativa para ambas especies asociada a la cuantificación de daño, ya que a mayor nivel de daño en el ADN (TMO) implicó una mayor actividad metabólica la cual se relaciona al metabolismo de reparación activo.

En todos los arroyos muestreados, Gt mostró mayor talla (Ls) y peso total (Pt), si bien se esperaba que en los sitios G ambas especies mostraran valores máximos para ambos, sin embargo solo los individuos de Bi mostraron este patrón. Por su parte los individuos de mayor volumen de Gt se colectaron en los sitios AA. Para ambas especies los individuos más pequeños se ubicaron en los sitios A, los cuales contaron con la mayor concentración de NT y PT. En particular dentro de estos sitios el arroyo Durán contó con valores de oxígeno disuelto (OD) muy bajos al igual que Tupambaé, pero en este último caso no se manifestaron cambios significativos en talla y peso asociados. El patrón de crecimiento de cada especie fue muy similar, si bien los valores de *b* para ambas en todos los sitios fueron significativos, de acuerdo Carlander (1969) y Froese (2006) el crecimiento es isométrico, a excepción de los individuos de Bi del arroyo Vejigas Chico quienes mostraron crecimiento alométrico positivo, siendo mayor su peso que su talla. Este tipo de crecimiento desproporcionado entre peso y longitud, indicaría una buena condición de estos peces en el momento del muestreo (Martinez et al., 2002). Las tallas para ambas especies correspondieron a individuos adultos (Loureiro et al., 2016; Kokubun et al., 2018) lo que contribuyó en la disminución de ruido y falsos positivos respecto a la sensibilidad a diferentes componentes para los marcadores moleculares analizados ya que peces adultos tienen la misma sensibilidad (Bolognesi et al., 2006).

Los resultados mostraron la existencia de variaciones en el perfil de genotoxicidad según la especie asociada a su ubicación en la red alimenticia de los sistemas. Dichas especies si bien se diferencian en sus hábitos (Bt asociado a la columna de agua y Gt al fondo), cohabitan el mismo ambiente perturbado, por lo que los resultados obtenidos estarían poniendo en evidencia la existencia de una sensibilidad diferencial frente a los mismos agentes tóxicos presentes en el agua. Dichas respuesta influye directamente

sus relaciones dentro del ecosistema acuático. Estas relaciones a nivel ecosistémico son moldeadas por los distintos niveles tróficos en los que ellas habitan.

Predadores tope y aquellos en niveles superiores de la red alimenticia como en el caso de los peces piscívoros aquí analizados, junto con los detritívoros, bioacumulan y concentran los contaminantes presentes en el agua (Grisolia et al., 2009; Villar et al., 2014) alcanzando niveles que pueden mostrar genotoxicidad en muy poco tiempo de exposición (Barbosa et al., 2003). Este comportamiento se ha registrado en peces de la cuenca del Amazonas, donde la bioacumulación de mercurio está directamente relacionada con su ubicación en la red trófica (Grisolia et al., 2009). Los estudios realizados en sedimento con peces como indicadores, mostraron mayor nivel de daño y concentración de contaminantes en peces de niveles superiores que en peces herbívoros de hábitos pelágicos, tal como Bi (Caldas et al., 1999). Estos últimos, son de hábitos mas plásticos, siendo los Charasiformes reportados como generalistas (Kokubun et al., 2018) y pueden cambiar sus hábitos alimenticios como respuesta adaptativa al estrés ambiental. Por lo tanto, cuando se trabaja con especies centinelas de este tipo, además de los hábitos alimentarios, se deben considerar también cambios en el comportamiento debido a un ambiente estresante (Grisolia et al., 2009; De Souza Filho et al., 2013a; Lanctot et al., 2016; Hamilton et al., 2017) a la hora de definir las especies centinelas como un mejor bioindicador de contaminación acuática.

Los resultados apoyan la premisa de que los peces son organismos adecuados para pruebas con marcadores moleculares ya que por ser los peces bioconcentradores de muchos contaminantes, incluso a bajas concentraciones, ponen en peligro su fisiología y supervivencia y lo manifiestan activamente mediante cambios a nivel molecular de manera instantánea sin necesidad de ser expuestos por largos periodos para manifestar un efecto sobre ellos (Hooftman y Raat, 1982; Goksoyr et al., 1991; Palhares y Grisolia, 2002; Miracle y Ankley, 2005; Grisolia et al., 2009; Melo et al., 2014)

Conclusiones

En todos los tipos de usos del suelo aquí analizados, ganadero, agrícola, agrícola-ganadero y urbano, se confirmó la existencia de efectos ambientales sobre los ecosistemas. La ganadería fue el uso del suelo de menor efecto en comparación al resto.

El uso de biomarcadores a diferentes niveles de organización mostró ser una aproximación apropiada cuando se pretende un abordaje integral a la hora de investigar la relación causal entre la exposición a poluentes ambientales y sus efectos a largo, mediano y corto plazo sobre los individuos .

Este trabajo mostró que el uso de peces como bioindicadores en diferentes niveles de organización biológica, tanto a nivel comunitario, poblacional y de individuo brinda información y es efectiva.

A nivel comunitario y poblacional el impacto se observó mediante cambios en la estructura y composición comunitaria así como por medio de marcadores somáticos luego de una exposición crónica sostenida en el tiempo pero a largo plazo.

A nivel de individuo los marcadores moleculares permitieron observar y cuantificar el daño en instancias tempranas. De los biomarcadores utilizados el ensayo cometa y el test de micronúcleos fueron los más efectivos para el análisis del efecto de los diferentes usos del suelo sobre los ecosistemas acuáticos. No solo por su simpleza, rapidez en realización y análisis sino por su alta sensibilidad y baja necesidad de individuos para el análisis, brindaron idea clara de la existencia niveles de perturbación crónico y agudo a los que están expuestos los peces actualmente en los arroyos analizados.

La especies centinelas seleccionadas permitieron observar sensibilidad, especie específica asociada a sus hábitos. Dichas especies por sus características y resultados obtenidos serían buenos bioindicadores para los arroyos de Uruguay, pero son necesarios más muestreos para su verificación.

ANEXO

Anexo1.1. Parámetros físico-químicos relevados a campo en cada arroyo muestreado. (Con: conductividad; % O2 dis: porcentaje de oxígeno disuelto en agua. (G: ganadero; A: agrícola ; AA: agrícola-ganadero; U: urbano.

N	Arroyo	Grupo	Temperatura (°C)	pH	Cond (us/cm)	%O2 dis
1	Curupí	G	25,46	7,89	277	100,3
2	Tupambae	G	25,11	7,46	178	100,8
3	Talita	G	21,33	7,97	304	66,5
4	Insaurral	G	24,4	8,28	492	105,1
5	Cochengo	G	22,9	7,29	268	53,09
6	De las Piedras	A	24,07	7,35	682	72
7	Cañada del Dragón	A	23,14	7,38	249	67
8	Sauce de Berna	A	24,39	7,82	784	170,7
9	Duran	A	18,66	7,32	773	33,3
10	De la Pedrera	A	20,52	7,45	696	64,8
11	Sauce	A	23,48	6,79	105	68,6
12	Juncal	A	23,45	7,56	653	61,2
13	Nuevo 10	A	24,78	7,66	501	120,6
14	Gadea	AA	25,63	7,45	1057	16,6
15	Pando	AA	21,63	4,43	767	65
16	De las violetas	AA	20,36	7,11	726	42,6
17	Negro Paciencia	AA	20,68	7,55	835	29,1
18	Totoral	AA	18,66	7,32	773	33,3
19	Cañada Grande	AA	21,73	7,58	1051	58,1
20	Sauce de Solís	AA	25,06	7,85	657	64,34
21	Feliciano	AA	22,27	7,28	615	47,7
22	Sin nombre 1	AA	27,6	7,65	461	72,8
23	Sin nombre 8	AA	23,7	8,41	660	130
24	Vejigas chico	AA	25,62	7,58	611	71,2
25	Del Colorado	U	23,53	7,43	459	59,6
26	Las Piedras	U	25,28	7,66	800	46,2
27	Colorado	U	26,55	7,35	812	54,5

Bibliografía

- Adams. S, Greeley. M, Jiménez. B, Ryon. M, Shugart. L y McCarty J (1989). The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Mar. Env. Res.* 28: 459-464.
- Addison. RF (1984). Hepatic mixed functions oxidase induction in fish as possible biological monitoring system, p. 51-60. *In* P. Hodson & J. Niragu (eds.). Contaminant effects on fisheries. Wiley, Nueva York, EEUU.
- Aito. A y Kalio. A (1999). Exposure and effect monitoring. *Toxicology letters*. Vol 108: 137-142.
- Aguilar. C y González-Sansón.G (2000). Influencia de la contaminación de la Bahía de La Habana, Cuba sobre las asociaciones de peces costeros, 1. Abundancia y Diversidad. *Rev. Invest. Mar.* 211: 60-70.
- Al-Sabti. K (1991). Handbook of Genotoxic Effects and Fish Chromosomes. J. Stefan Institute, University of California .Jamova.
- Al-Sabti. K y Metcalfe. CD (1995). Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*. 343: 121-135.
- Alexandre. CV, Esteves. KE, Moura y Mello. MAM (2010). Analysis of fish communities along a rural–urban gradient in a neotropical stream (Piracicaba River Basin, São Paulo, Brazil). *Hydrobiologia* 641:97–114.
- Alexander. TJ, Vonlanthen. P y Seehausen. O (2017). Does eutrophication-driven evolution change aquatic ecosystems? *Phil. Trans. R. Soc. B* 372, 20160041. doi:10.1098/rstb.2016.0041
- Alexandratos. N y Bruinsma.J (2012). World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision, FAO, Rome.
- Allan. J (2004). Landscapes and riverscapes: the influences of land use on stream ecosystems. *Annu Rev. Ecol. Evol. S* . 35: 257-284.
- Allan. JD y Castillo. MM(2007). Stream Ecology: Estructure and Function of Running Waters. Segunda edición, Chapman y Hall, NY.
- Allen. AP, Gillooly. JF, Savage. VM y Brown. JH (2006). Kinetic effects of temperature on rates of genetic divergence and speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 9130–9135.
- Alloway BJ. (1995). Heavy Metal in Soils, 2nd ed. London: Blackie Academic & Professional. 368 pp.
- Anderson. MJ (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *austral ecology*.
- Angermeier. Pl y Karr.JR(1983). Fish communities along environmental gradients in a system of tropical streams. *Environmental Biology of Fishes*, 9: 117-135.
- Aonghusa NC y Gray NF. (2002). Laundry detergents as a source of heavy metals in Irish domestic wastewater. *J Environ Sci Health* 37: 1–6.
- Arismendi .I, Penaluna. B y Soto. D (2011). Body condition indices as a rapid assessment of the abundance of introduced salmonids in oligotrophic lakes of southern Chile. *Lake and Reservoir Management* 27:61–69.
- Asker. N, Carney.A, Albertsson. B, Coltellaro.E, Bignell.M, Hanson. J, Scarcelli. N ,Fagerholm. V , Parkkonen. B , Wijkmark. J ,Frenzilli. E, Förlin, L y Sturve. J (2015). A gene to organism approach -

- assessing the impact of environmental pollution in eelpout (*Zoarces viviparus*) females and larvae. Environmental toxicology and chemistry / SETAC. 34. 10.1002/etc.2921.
- Arendt. J (1997). Adaptive Intrinsic Growth Rates: An Integration Across Taxa. The Quarterly Review of Biology, 72: 2, 149-177pp.
- Arocena. R, Chalar. G y Pacheco. JP (2018). Agriculture and elevation are the main factors for Pampasic stream habitat and water quality. Environ Monit Assess , 190:254
- Avci. A, Kaçmaz . M y Durak. İ (2005). Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. Ecotoxicol. Environ. Saf. 60 (1), 101–105.
- Barsiene .J, Lehtonen. KK, Angela. K, Broeg .K, Vuorinen. PJ, Lang. T, Pempkowiak. J, Syvokiene. J, Dedonyte. V, Rybakovas. A, Repecka. R, Vuontisjarvi. H y Kopecka. J(2006). Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and mussel (*Mytilus edulis*) in the Klaipeda-Butinge area (Baltic Sea). Mar Pollut Bull 53:422–436.
- Baird. D y Van den Brink .P (2007). Using biological traits to predict species sensitivity to toxic substances. Ecotoxicol Environ Saf : 67:296–301.
- Balboni. L , Colautti. DC y Baigún.CR (2011). Biology of growth of *Hoplias aff. malabaricus* (Bloch, 1794) in a shallow pampean lake (Argentina). Neotropical Ichthyology, 9(2):437-444, 2011
- Ballesteros. ML, Rivetti. NG, Morillo. DO , Bertrand. L, Amé. MV y Bistoni. MA (2017). Multi-biomarker responses in fish (*Jenynsia multidentata*) to assess the impact of pollution in rivers with mixtures of environmental contaminants. Science of the Total Environment 595 (2017) 711–722
- Benejam.L, Teixeira de Mello. F, Meerhoff. M , Loureiro. M ; Jeppesen. E y Brucet. S (2016). Assessing effects of change in land use on size-related variables. Canadian Journal of fisheries and Aquatic science; 73: 1–10.
- Batista .NJ, Carvalho. M, Oliveira .MG, Medeiros. EC, Machado .JL, Evangelista. SR, Dias. JF, Santos. CE, Duarte. A, Silva. FR y Silva .J (2016). Genotoxic and mutagenic evaluation of water samples from a river under the influence of different anthropogenic activities. Chemosphere 164(1):134–141.
- Barbosa AC, Souza J, Dórea JG, Jardim WF y Fadini PS (2003). Mercury biomagnification in a tropical black water, Rio Negro, Brazil. Arch Environ Contam Toxicol 45:235-246.
- Bednarova. Z, Kuta .J, Kohut. L, Machat. J, Klanova. J, Holoubek. I, Jarkovsky. J, Dusek. L, y Hilscherova. K (2013). Spatial patterns and temporal changes of heavy metal distributions in river sediments in a region with multiple pollution sources. J Soils Sedim 13(7):1257– 1269
- Benítez-Leite. S, Macchi. ML, Fernández. V, Franco. D, Ferro. E, Mojoli. A, Cuevas. F, Alfonso. J y Sales. L (2010). Daño celular en una población infantil potencialmente expuesta a pesticidas. Revista Pediatría (Asunción); 37: 97-106pp.
- Bergeron. JP (1997). Nucleic acids in ichthyoplankton ecology: a review, with emphasis on recent advances for new perspectives. Journal Fish Biology; 51: 284-302pp.
- Bianchi .E, Goldoni .A, Trintinaglia. L, Lessing .G, Silva. CEM, Nascimento. CA, Ziulkoski .AL, Spilki .Fr y Silva .LB (2015). Evaluation of genotoxicity and cytotoxicity of water samples from the Sinos River Basin, southern Brazil. Braz J Biol 75(2):68–74pp. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.1913>

- Binohlan. C y Pauly .D (1998). The length–weight table.pag 121–123: R. Froese, y D. Pauly (eds). Fishbase 1998: concepts, design and data sources. ICLARM, Manila.
- Bisson. PA, Quinn .TP, Reeves .GH y Gregory .SV (1992). Best management practices, cumulative effects, and longterm trends in fish abundance in Pacific Northwest river systems. In: Naiman RJ (ed) Watershed Management: Balancing Sustainability and Environmental Change. Springer-Verlag, New York, pp 189–233
- Bistoni. MA, Hued. A ,Videla. M y Sagretti. L (1999). Efectos de la calidad del agua sobre las comunidades ícticas de la región central de Argentina. Revista Chilena de Historia Natural 72: 325-335.
- Bogoni JA, Armiliato N, Araldi-Favassa CT y Techio VH (2014) .Genotoxicity in *Astyanax bimaculatus* (Twospot *Astyanax*) exposed to the waters of Engano River (Brazil) as determined by micronucleus tests in erythrocytes. Arch Environ Contam Toxicol 66(3):441–449pp. -Bolognesi. C, Buschini. A, Branchi. E, Carboni. P, Furlini. M, Martino. A, Monteverde. M, Poli. P y Rossi. C (2004). Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking wáter treated with three different disinfectants. Science of the Total Environment ; 333: 1-3, 127-136pp.
- Bolognesi.C, Perrone. E, Roggeri. P y Sciutto. A(2006). Bioindicators in monitoring long term genotoxic impact of oil spill: Haven case study. Mar Environ Res. 62: 2872-91pp.
- Bolognesi. C y Hayashi. M (2011). Micronucleus assay in aquatic animals. Mutagenesis 26(1):205–213pp.
- Bolognesi. C y Fenech. M (2012). Mussel micronucleus cytome assay.Nature protocols .7:6, pag 1125-1137pp.
- Bombail. V, Dennis. A, Gordon. E y Batty. J (2001). Application of the comet and micronucleus assays to butterflyfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth an Forth, Scortanld. Chemosphere; 44: 383-392pp.
- Bonifacio. AF, Cazenave. J, Bacchetta. C, Ballesteros. ML, Bistoni. M, Ame. MV, Bertrand. L y Hued AC (2016). Alterations in the general condition, biochemical parameters and locomotor activity in *Cnesterodon decemmaculatus* exposed to commercial formulations of chlorpyrifos, glyphosate and their mixtures. Ecol Indic 67:88–97pp.
- Bonilla. S, Haakonson. S,Somma. A , Gravier. A , Britos. A , Vidal.L , De León. L , Brenan. B, Pérez. M, Piccini. C, Martínez de la Escalera M, Chalar. G, González-Piana. M , Martigani. F y Aubriotet. L. (2015). Cianobacterias y cianotoxinas en ecosistemas límnicos de Uruguay. INNOTECH 10: 9-22pp
- Breitburg. D (2002). Effects of hypoxia and the balance between hypoxia and enrichment, oncoastal fish and fisheries. Estuaries 25: 767-781pp.
- Brower. JE, Zar. JH, von Ende, C.N. 1998. Field and Laboratory Methods for General Ecology. McGraw-Hill, Boston.
- Bucheli. T y Fent. K (1995).Induction of cytochrome P-450 as a biomarker for environmental contamination.Crit. Rev. Env. Sci. Technol.; 25: 201-268pp.
- Buckley. L (1984). RNA – DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea. Mar. Biol.; 80: 291-298pp.

- Buckley. LJ, Caldarone. EM y Clemmesen. C (2008). Multi-species larval fish growth model based on temperature and fluorometrically derived RNA / DNA ratios: results from a meta-analysis. *Mar Eco prog series*. 371:221-232pp.
- Burrell. ED, Duarte. A, Gangloff. MM y Siefferman. L (2013). Isotopic trophic guild structure of a diverse subtropical South American fish community. *Ecol Freshw Fish*, 22: 66-72pp.
- Cabrera Páez. Y, Aguilar Betancourt. C y González-Sansón. G (2008). Indicadores morfológicos y reproductivos del pez *Gambusia puncticulata* (Poeciliidae) en sitios muy contaminados del río Almendares, Cuba. *Revista de Biología Tropical*, 56(4), 1991-2004.
- Caldarone. EM, Onge-Burns. J y Buckley. L (2003). Relationship of RNA/DNA ratio and temperature to growth in larvae of atlantic cod *Gadus morhua*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*; 262, 229–240.
- Caldas ED, Coelho R, Souza LCKR y Silva SC (1999). Organo-chlorine pesticides in water, sediment and fish of Paranoá Lake of Brasília, Brazil. *Bull Environ Contam Toxicol* 62:199-206
- Carignan. V y Villard. MA (2002). Selecting indicator species to monitor ecological integrity: review. *Environ. Monit. Asses.*; 78, 45–61pp.
- Cestari. MM, Lemos. PM, de Oliveira Ribeiro. CA, Alves Costa. JA, Pelletier. E, Ferraro.M, Mantovani. MS y Fenocchio. A (2004). Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. *Genetics and Molecular Biology*, 27, 2, 270-274.
- Cairns. J, McCormick. PV y Niederlehner. BR (1993). A proposed framework for developing indicators of ecosystem health. *Hydrobiologia* 236, 1–44pp.
- Campoblanco Diaz. H y Gomero Torres. J (2000). Importancia de los ríos en el entorno ambiental. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Geología, Minas, Metalúrgica y Ciencias geográficas*. Lima- Perú. Vol 3: 5.
- Carlander, K.D. (1969). *Handbook of freshwater fishery biology*. University Press, The Iowa State, EEUU. Vol.I 752 pp.
- Casatti. L , Langeani. F y Pereira. CP (2006). Effects of physical habitat degradation on the stream fish assemblage structure in a pasture region. *Environmental Management* 38:974-982pp.
- Casatti. L, Ferreira. CP y Carvalho.FR (2009). Grass-dominated stream sites exhibit low fish species diversity and dominance by guppies: an assessment of two tropical pasture river basins. *Hydrobiologia*, 632: 273-283.
- Casatti. L, Teresa. F B, Gonçalves-Souza. T, Bessa. E, Manzotti. AR, Gonçalves.CS y Zeni. J O(2012). From forests to cattail: how does the riparian zone influences stream fish? *Neotropical Ichthyology* 10(1):205-214.
- Çavaş.T y Ergene.S (2005). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat. Toxicol.* 74 (3), 264–271.

- Cazenave. J, Bacchetta. C, Parma. MJ, Scarabotti. PA y Wunderlin. DA (2009). Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Environ Pollut* 157:3025–3033.
- Cingolani. AM; Anchorena. J; Stoffella. S y Collantes. MB (2002). A landscape-scale model for optimal management of sheep grazing in the Magellanic steppe. *Appl. Veg. Sci.* 5:159-166
- Cingolani. AM; Noy-Meir. I; Rension. D y Cabido. M (2008). La ganadería extensiva: ¿es compatible con la conservación de la biodiversidad y de los suelos? *Ecol. Austral*; .18 (3) ,253-271pp.
- Chalar. G, Delbene. L, González-Bergonzoni. I y Arocena. R(2013). Fish assemblage changes along a trophic gradient induced by agricultural activities (Santa Lucía, Uruguay). *Ecol. Indic.* **24**: 582–588pp.
- Chicharo. MA y Chicharo. L (2008). RNA: DNA ratio and other nucleic acid derived indices in marine ecology. *Int. J. Mol. Sci.* 9, 1453–1471pp.
- Choudhury. C, Ray.A, Bhattacharya.S y Bhattacharya.S (1993). Non-lethal concentrations of pesticide impair ovarian function in the freshwater perch, *Anabas testudineus*. *Environmental Biology of Fishes*, vol. 36, no. 3, pp. 319-324.
- Cifuentes. R, González. J, Montoya. G,Jara. A, Ortíz. N, Piedra. P y Habit. E (2012). Relación longitud-peso y factor de condición de los peces nativos del río San Pedro (cuenca del río Valdivia, Chile). *Gayana* 75(2),102
- Clarke. KR. (1993). Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. *Aus. J. Ecol*, 18; 117-143pp.
- Clarke. KR y Warwick. RM (2001). Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation, 2nd ed., PRIMER-E, Plymouth, 172 p.
- Clemmesen .C (1988). A RNA and DNA fluorescence technique to evaluate the nutritional condition of individual marine fish larvae. *Meeresforschung*; 32: 134-143.
- Clemmesen. C (1993). Improvements in the fluorometric-determination of the RNA and DNA content of individual marine fish larvae. *Marine . Ecology . Prog. Se*; 100, 177–183.
- Clemmenssen .C, Sanchez .R y Rossi-Wongtschowsky .L(1997). A regional comparison of the nutritional condition of Atlantic anchovy Larvae, *Engraulos anchata*, based on RNA/DNA ratios. *Arch. Fish. Mar. Res.* 45: 17- 43pp.
- Costa. PM, Neuparth. TS, Caeiro. S, Lobo. J, Martins. M, Ferreira. AM, Costa. MH (2011). Assessment of the genotoxic potential of contaminated estuarine sediments in fish peripheral blood: laboratory versus in situ studies. *Environ. Res.* 111 (1), 25–36.
- Cowx. IG y Broughton. NM (1986). Changes In the species composition of anglers' catches in the River Trent (England) between 1969 and 1984. *J. Fish Biol.* 28, 625–636.
- Da Silva Corrêa. A, Abessa, S, Gomes dos Santos.L ,Bezerra Da Silva E y Seriani.R (2016). Differential blood counting in fish as a non-destructive biomarker of water contamination exposure. *Toxicological & Environmental Chemistry.* 1-10.
- Davis. JC (1986). *Statistics and Data Analysis in Geology.* John Wiley & Sons.

- De Vlaming .VL, Grossman. G y Chapman. F (1981).On the use of gonadosomatic index. Comparative Biochemistry and Physiology, vol. 73A, pp. 31-39.
- De Souza Filho. J, Sousa. CN, Da Silva, C. C., De Sabóia-Morais, S. M. T. and Grisolia, C. K. (2013a). Mutagenicity and Genotoxicity in Gill Erythrocyte Cells of *Poecilia reticulata* Exposed to a Glyphosate Formulation Bul. of Env. Cont. and Tox., 91(5), 583-587.
- De Souza Filho. J,Pires. F, Grisolia1.CK y Teixeira De Sabóia-Morais. M (2013b). Toxicological effects of a glyphosate-based formulation on the liver of *Poecilia reticulata*. Current Topics in Toxicology
- Depledge. MH y Fossi. MC (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. Ecotoxicology 3, 161-172.
- Dias. M , Zuanon. J, Couto. TBA,Carvalho. M, Carvalho. LN, Espírito-Santo. H MV, Frederico. R, Leitão. RP, Mortati. AF, Pires. THS ,Torrente-Vilara. G , doVale. J , dos Anjos. MB ,Mendonça. FP y Tedesco. P (2016). Trends in studies of Brazilian stream fish assemblages Natureza & Conservação;14,(2), 106-111pp.
- Dirección de Estadísticas Agropecuarias (DIEA) (2018). Anuario estadístico. <http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/oficina-de-programacion-y-politica-agropecuaria/estadisticas-y-documentos/29-08>
- Di Marzio. W, Tortorelli. MC y Freyre. L (2003). Diversidad de peces en un arroyo de llanura Limnetica 22(3-4):71-76.
- Diop. M, Howsam. M, Diop. C, Goossens. JF, Diouf. A y Amara. R (2016). Assessment of trace element contamination and bioaccumulation in algae (*Ulva lactuca*), mussels (*Perna perna*), shrimp (*Penaeus kerathurus*), and fish (*Mugil cephalus*, *Sarotherodon melanocheilus*) along the Senegalese coast. MarPollutBull; 103(1–2):339–343pp.
- Dourado. PL, Rocha. MP, Roveda. LM, Raposo. JL, Junior- Cândido. LS, Cardoso. CA, Morales. MA, Oliveira. KM y Grisolia. AB (2016). Genotoxic and mutagenic effects of polluted surface water in the midwestern region of Brazil using animal and plant bioassays. Genet Mol Biol 40(1):123–133. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2015-0223>
- Dursinska. M y Collins. AR (2008). The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interaction. Mutagenesis ; 23(3): 191-205pp.
- Englert. D, Zubrod. JP, Schulz. R. y Bundschuh. M(2015). Variability in ecosystem structure and functioning in a low order stream: Implications of land use and season. Science of the Total Environment 538:341-349.
- Ergene.S, Cavas. T, Celik. A, Köleli, N y Aymak, C. (2007a). Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test. Environmental and molecular mutagenesis. 48. 421-9.
- Ergene. S, Cavas.T, Ayla. C, Köleli. N, Kaya. F y Karahan. A (2007b). Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. Ecotoxicology (2007) 16:385–391.
- Fagan. W (1997). Omnivory as a stabilizing feature of natural communities. The American Naturalist. Vol. 150, No. 5 .
- Fahrig. L (2003). Effects of habitat fragmentation on biodiversity. Annual Reviews of Ecology and Systematics, 34: 487-515

- Farley. KA, Jobbágy .EG y Jackson. RB (2005). Effects of afforestation on water yield: a global synthesis with implications for policy. *Global Change Biology* 11: 1565-1576.
- Fausch. KD, Lyons. J, Karr. JR y Angermeier.PL (1990). Fish communities as indicators of environmental degradation. *American Fisheries Society Symposium* 8:123– 144
- Feld. D, Birka. S, Emeb.D , Gerischc.M, Heringa. D, Kernand. M, Mailehte.M , Mischkef. U, Otte.I, Pletterbauer. F, Poikaneh. S, Salgadod. J, Sayerd. CD , Van Wicheleni. J y Malard. M (2016). Disentangling the effects of land use and geo-climatic factors on diversity in European freshwater ecosystems. *Ecological Indicators* 60 : 71–83
- Ferraro. MV, Fenocchio. A, Mantovani. M, de Oliveira Ribeiro. C y Cestari. M (2004). Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genetics and Molecular Biology*, 27, 1, 103-107
- Fonseca.VF, França. S, Serafim. A, Company.R, Lopes.B, Bebianno. MJ y Cabral. HN (2011). Multi-biomarker responses to estuarine habitat contamination in three fish species: *Dicentrarchus labrax*, *Solea senegalensis* and *Pomatoschistus microps*. *Aquat. Toxicol.* 102 (3), 216–227pp.
- Foley. JA, DeFries. R, Asner. GP, Barford. C, Bonan. G, Carpenter . SR, Chapin. FS, Coe. MT, Daily. GC, Gibbs. HK, Helkowski. JH, Holloway. T, Howard. EA, Kucharik. CJ, Monfreda. C, Patz. JA, Prentice. IC, Ramankutty.N y Snyder.PK(2005). Global consequences of land use, *Science*, 309, 570–574pp.
- Forchhammer.L, Bräuner. EV,Folkmann. JK, Danielsen. PH, Nielsen. C, Jensen. A, Loft .S, Friis. G y Møller. P(2008). Variation in assessment of oxidatively damaged DNA in mononuclear blood cells by the comet assay with visual scoring. *Mutagenesis*. 23(3):223-31.
- Frenzilli. G, Nigro. M y Lyons. BP (2009). The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research*. 681, pag 80-92.
- Froese. R (2006). Cube law, condition factor and weight–length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology*, vol. 22, no. 4, p. 241-253.
- Froese. R, Tsikliras. A y Stergiou. K (2011). Editorial note on weight–length relations of fishes. *acta ichthyologica et piscatorial*. 41 (4): 261–263
- Frommel. A y Clemmesen. C (2009).Use of biochemical indices for analysis of growth in juvenile two-spotted gobies (*Gobiusculus flavescens*) of the Baltic Sea. *Sci. Mar.* 73S1: 159-170pp.
- Furnus. GNA, Caffetti. JD, García. EM, Benítez. MF, Pastori. MC y Fenocchio, AS (2004). Baseline micronuclei and nuclear abnormalities frequencies in native fishes from the Paraná River (Argentina). *Braz. J. Biol.* 74 (1) p. 217-221pp.
- Giltrap. M, Ronan. J,Bignell. J, Lyons. B, Collins. E, Rochford. H, McHughB, McGovern. E, Bull. L y James Wilson (2017). Integration of biological effects, fish histopathology and contaminant measurements for the assessment of fish health: A pilot application in Irish marine waters. *Marine Environmental Research* .Vol: 129
- Gárriz Á, Del Fresno PS, Carriquiriborde P y Miranda LA (2018). Effects of heavy metals identified in Chascomús shallow lake on the endocrine- reproductive axis of pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis*). *Gen Comp Endocrinol* S0016–6480(17):30874-2.

- Gil. H, Chung. K, Lemus. M y Altuve. D (2003). Relación ARN/ADN como índice de condición fisiológica del híbrido de la cachama *Colossoma macropomum* y el morocoto *Piaractus brachipomus* durante el desarrollo embrionario. *Rev. Biol. Trop.*, 51, Supl. 4: 91-96.
- Gilliers. C, Le Pape. O, Desaunay. Y, Bergeron. JP, Schreiber. N, Gualut. D y Amar. R (2006). Growth condition of juvenile sole (*Solea solea* L.) as indicators of habitat quality in coastal and estuarine nurseries in the Bay of Biscay with a focus on sites exposed to the Erika oil spill. *Sci. Mar.* 70S1: 183-192pp.
- Goksoyr. A, Anderson. T, Buhler. DR, Stegerman. JJ, Williams. DE y Forlin. L (1991). Immunochemical cross-reactivity of 2-naphthoflavone inducible cytochrome P450 (P450 IA1) in liver microsomes from different fish species and rat. *Fish Physiol Chem* 9:1-13pp.
- González-Bergonzoni. I, Jeppesen. E, Vidal. N, Teixeira-de Mello. F, Goyenola. G, López-Rodríguez. A y Meerhoff. M (2016). Potential drivers of seasonal shifts in fish omnivory in a subtropical stream. *Hydrobiologia*, 768: 183-196pp.
- Granado. C (1996). *Ecología de peces*. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla. Sevilla, España. 353 pp.
- Griffero. L, Gomes. G, Berazategui. M, Fosalba. C, Teixeira de Mello. F, Rezende. CE, Bila. DM y García-Alonso. J (2018). Estrogenicity and cytotoxicity of sediments and water from the drinkwater source-basin of Montevideo city, Uruguay. *Ecotoxicol. Environ. Contam.*; 13(1), 15-22pp.
- Grizzetti. B, Pistocchi. A, Liqueste. C, Udias. A, Bouraoui. F y Van de Bund. W (2017). Human pressures and ecological status of European rivers *Nature Scientific Reports*; 7: 205.
- Grisolia. CK (2002). A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutation Research* 518 (2002) 145–150
- Grisolia. CK, Rivero. CL, Starling. FL, Da Silva. IC, Barbosa. AC y Dorea. JG (2009). Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genetics and molecular biology*, 32(1), 138-43.
- Gustavino B, Scornajenghi KA, Minissi S y Ciccotti E (2001) Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X-ray and colchicine. *Mutat Res* 494:151-159.
- Gusso-Choueri. PK, Choueri. RB, De Araújo. GS, Cruz. ACF, Stremel. T, Campos. S y Ribeiro. CA (2015). Assessing pollution in marine protected areas: the role of a multi-biomarker and multi-organ approach. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 18047–18065.
- Gusso-Choueri, P.K., Choueri, R.B., Santos, G.S., de Araújo, G.S., Cruz, A.C.F., Stremel, T y Abessa, D.M.S (2016). Assessing genotoxic effects in fish from a marine protected area influenced by former mining activities and other stressors. *Mar. Pollut. Bull.* 104 (1–2), 229–239.
- Gutiérrez. JM, Villar. S y Acuña Plavan. A (2015). Micronucleus test in fishes as indicators of environmental quality in subestuaries of the Río de la Plata (Uruguay) *Marine Pollution Bulletin* 91 (2015) 518–523.
- Hamilton PB, Rolshausen G, Uren Webster TM, Tyler CR. (2017). Adaptive capabilities and fitness consequences associated with pollution exposure in fish. *Phil. Trans. R. Soc. B* 372: 20160042.

- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. y Ryan, P.D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp.
- Harper, D.A.T. (1999). *Numerical Palaeobiology*. John Wiley & Sons.
- Hayashi, M (2016). The micronucleus test- most widely used *in vivo* genotoxicity test- Review. *Genes and Environment* ;38(18) .
- Heddle, J A, Hite, M, Jrkhardt, B, Macgregor, J y Salamone, M (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. *Mutation Research* 123: 61-118pp.
- Hette-Tronquart, N, Oberdorff, T, Tales, E, Zahm, A y Belliard, J (2017). Biological impacts of local vs. regional land use on a small tributary of the Seine River (France): insights from a food web approach based on stable isotopes. *Environ Sci Pollut Res Int.* 24:23583-23594.
- Hemachandra, C.K y Pathiratne, A (2016). Combination of physico-chemical analysis, *Allium cepa* test system and *Oreochromis niloticus* erythrocyte based comet assay/nuclear abnormalities tests for cytogenotoxicity assessments of treated effluents discharged from textile industries. *Ecotox Environ Saf* 131(1):54–64. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.05.010>
- Herrera-Reveles, A, Lemus, M y Marín, B (2012). Crecimiento somático y relación ARN/ADN en estadios juveniles de *Eucinostomus argenteus* (Pisces: Gerreidae) en dos localidades del Caribe de Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, vol. 60, (1), 151-163pp.
- Herrera-Valdivia, E, López-Martínez, J y Castillo Vargasmachuca, S (2015). Estrés en la comunidad íctica en la pesca de arrastre del camarón en el norte del Golfo de California. *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744)* Vol. 63 (3): 741-754
- Hoekstra, J.M, Boucher, T.M, Ricketts, T.H y Roberts, C (2005). Confronting a biome crisis: global disparities of habitat loss and protection. *Ecology Letters* 8:23-29pp.
- Hooftman, R.N y Raat, W.K (1982). Induction of nuclear abnormalities (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. *Mutat Res* 104:147-152.
- Hued, A C y Bistoni, M.A (2005). Development and validation of a Biotic Index for evaluation of environmental quality in the central region of Argentina. *Hidrobiología* 543:279-298.
- Hussain, B, Sultana, T, Sultana, S, Mahboob, S, Al-Ghanim, K.A y Nadeem, S (2016). Variation in genotoxic susceptibility and biomarker responses in *Cirrhinus mrigala* and *Catla catla* from different ecological niches of the Chenab River. *Environ Sci Pollut Res Int.* ;23(14):14589-99.
- Hussain, B, Sultana, T, Sultana, S, Masoud, M, Ahmed, Z y Mahboob, S (2018). Fish eco-genotoxicology: Comet and micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ biomarker of freshwater pollution. *Saudi Journal of Biological Sciences* 25 (2018) 393–398pp.
- Hynes, H.B.N (1960). *The Biology of Polluted Waters*. Liverpool University Press, Liverpool.
- Hyun-Mi, K, Dae-Seon, K y Young-Hee, C (2006). Environmental Genomics Related to Environmental Health Biomarker. *Molecular and Cellular Toxicology*. Vol2(2): 75-80.

- Jebali. J, Sabbagh. M, Banni. M, Kamel. N, Ben-Khedher. S, M'hamdi. N y Boussetta. H (2013). Multiple biomarkers of pollution effects in *Solea solea* fish on the Tunisia coastline. Environ. Sci. Pollut. Res. 20 (6), 3812–3821pp. . <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1321-2>
- Jeje.Y (2006). Southern Alberta Landscapes: Meeting the Challenges ahead. Export coefficients for total phosphorus, total nitrogen and total suspended solids in the Southern Alberta region. A review of literature. Regional Environmental Management, Canada.
- Jellyman. PG, Booker. DJ, Crow. SK, Bonnett. ML y Jellyman. DJ (2013). Does one size fit all? An evaluation of length–weight relationships for New Zealand's freshwater fish species, New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 47:4, 450-468pp.
- Justus. BG, Petersen .JC, Femmer .SR, Davis.JV y Wallace.JE(2010).A comparison of algal, macroinvertebrate, and fish assemblage indices for assessing low-level nutrient enrichment in wadeable Ozark streams, Ecological Indicators, 10, 627-638pp.
- Karr. JR (1981). Assessment of biotic integrity using fish communities. Fisheries, 6(6), 21-27.
- Karr .JR, Fausch. KD, Angermeier. PL, Yant. PR y Schlosser.IJ(1986). Assessing biological integrity in running waters, a method and its rationale. Natural History Survey, Special Publication 5, Urbana, USA, 28 pp
- Kelly. BC, Ikonomou. MG, Blair. JD, Morin. AE y Gobas. FAPC (2007). Food web-specific biomagnifications of persistent organic pollutants. Science 317:236-239
- Kennish MJ. (2002). Environmental threats and environmental future of estuaries. Environ. Conserv. 29, 78–107.
- Kime, D. E. 1995. The effects of pollutions on reproduction in fish. Rev. Fish. Biol. Fish. 5: 52-96.
- Klein . RD (1979). Urbanization and stream quality impairment. Water Resource Bulletin 15: 948–963.
- Kokubun, É, Bonato. K . Orlandi. K, Burress. E y Fialho, C (2018). Diet and body shape among populations of *Bryconamericus iheringii* (Otophysi: Characidae) across the Campos Sulinos ecosystem. Neotropical Ichthyology, 16(4), e170167. Epub October 18, 2018.
- Koutrakis. ET y Tsikliras. AC (2003). Length–weight relationships of fishes from three northern Aegean estuarine systems (Greece). Journal of Applied Ichthyology **19** (4): 258–260.
- Koroleff. F (1970). Revised version of direct determination of ammonia of natural waters as indophenol blue. Int. Con. Explor. Sea C.M 1969/C9. ICES, Information on techniques and methods for sea water analysis. En: Interlab. Rep. , 3,19-22pp.
- Kühl. AM, Cardozo da Rocha. CLMS ,Espíndola. ELG y Lansac-Tôha. FA(2010). Rural and Urban Streams: Anthropogenic Influences and impacts on water and sediment quality. International Review of Hydrobiology 95(3):260-272pp.
- Kuopat. C, Mercaldo-Allen. R, Caldarone. E, Goldberg. R, Phelan. B y Thurberg. F (2002). Evaluation of RNA concentration as an indicator of growth in young-of-the-year winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* and tautog *Tautoga onitis*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 230, 265– 274.

- Laflamme.S, Côté. C,Gagnaire.P A, Castonguay.M y Bernatchez. L (2012). RNA/DNA ratios in American glass eels (*Anguilla rostrata*): evidence for latitudinal variation in physiological status and constraints to oceanic migration?. *Ecology and evolution*, 2(5), 875-84.
- Lampert .VR, Azevedo .MA y Fialho. CB (2004). Reproductive biology of *Bryconamericus iheringii* (Ostariophysi: Characidae) from rio Vacacaí, RS, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 2(4), 209-215.
- Landa. J y Antolínez. A (2017). Weight-length relationships, weight conversion factors and somatic indices from two stocks of black anglerfish (*Lophius budegassa*) and white anglerfish (*L.piscatorius*) in north-eastern Atlantic waters. *Regional Studies in Marine Science*.
- Lanctot. C, Melvin. SD , Leusch. F , Wilson. S y Fabbro. L (2016). Locomotor and behavioural responses of empire gudgeons (*Hypseleotris compressa*) exposed to coal mine wastewater. *Chemosphere* 144. 1560e1566
- Lee. RF y Steinert. S (2003). Use of single cell gel eletrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*, 544: 43-64.
- Legendre. P y Legendre. L (2012). *Numerical ecology* (Third English ed.). Amsterdam: Elsevier Science BV.
- Lehtonen. KK, Schiedek. D, Kohler. A, Lang. T, Vuorinen. PJ, Fcorlin. L, Barsiene. J, Pempkowiak . J y Gercken . J (2006). The BEEP project in the Baltic Sea: Overview of results and outline for a regional biological effects monitoring strategy. *Mar Pollut Bull* 53:523–537.
- Lester. RE, Wright.W y Jones-Lennon.M (2007). Does adding wood to agricultural streams enhance biodiversity? An experimental approach. *Marine and Freshwater Research*, 58: 687-698.
- Leung. HM, Leung. AOW, Wang. HS, KK. MA, Liang. Y, Ho. KC, Cheung. KC, Tohidi. F y Yung. KKL (2014).Assessment of heavy metals/metalloid (As, Pb, Cd, Ni, Zn, Cr, Cu and Mn) concentrations in edible fish species tissue in the Pearl River Delta (PRD), China. *Mar Pollut Bull* 78(1–2):235–245. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.10.028>
- Livingstone. DR (1993). Biotechnology and pollution monitoring - Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J Chem Technol Biotechnol* 57:195-211
- Lloret J y Planes S (2003). Condition, feeding and reproductive potencial of white seabream *Diplodus sargus* as indicators of habitat quality and the effect of reserve protection in the northwestern Mediterranean. *Mar Ecol Prog Ser*. 248:197-208pp.
- Lopes C, Herva M, Franco-Uría M y Roca E (2011). Inventory of heavy metal content in organic waste applied as fertilizer in agriculture: evaluating the risk of transfer into the food chain. *Environ Sci Poll Res* 18(6):918–939 pp.
- Loureiro. M, Zarucki. M, Malabarba. L, y Gonzalez-Bergonzoni. I (2016). A new species of *Gymnogeophagus* Miranda Ribeiro from Uruguay (Teleostei: Cichliformes). *Neotrop. Ichthyol*, vol.14, n.1
- Magurran. A (1989). “Diversidad ecológica y su medición”. Ediciones Vedra. 200 pp.
- Malabarba. LR, Neto. PC, Bertaco. VA, Carvalho. TP, Santos. JF y Artioli. LGS (2013). *Guia de identificação dos peixes da bacia do rio Tramandaí*. Porto Alegre/RS: Via Sapiens .

- Malmqvist.B y Rundle.S (2002). Threats to the running water ecosystem of the world. *Environmental Conservation* 29(2):134-153pp.
- Marinowic. D, Mergener. M, Pollo. T, Maluf. S y Basso da Silva. L (2012). *In vivo* Genotoxicity of the Pyrethroid Pesticide β -Cyfluthrin Using the Comet Assay in the Fish *Bryconamericus iheringii*. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen ·
- Martinez PCA, Barriga. TE, Taylor. JF, Rios. DG, Ross .LG (2002). Effect of temperature on growth and survival of *Chirostoma estor estor*, Jordan 1879, monitored using a simple video technique for remote measurement of length and mass of larval and juvenile fishes. *Aquaculture*. 209: 369–377.
- Matsumoto ST (2003) .Efeitos tóxicos e genotóxicos de metais pesados, especificamente do cromo trivalente e hexavalente. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’, São José do Rio Preto.
- Matsumoto. ST y Marin-Morales. MA (2004).Mutagenic potential of the water of a river that receives tannery effluent using the Allium cepa test system. *Cytologia* 69:399-408.
- Matsumoto. ST, Mantovani. MS, Malagutti. MI, Dias. AL ,Fonseca. IC y Marin-Morales. MA (2006). Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genetics and Molecular Biology*, 29 (1), 148-158pp.
- McCallum. H (2000). *Population Parameters: Estimation for Ecological Models*. Blackwell Science Ltd. Oxford, London. 348 pp.
- Melancon. MJ(1995). Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring. In Hoffman, D. J.; Rattner, B. A.; Burton, G. A.; Jr.; Cairns, J., and Jr. editors. *Handbook of ecotoxicology*. Boca Raton (FL) CRC Press; pp. 220-239.
- Melo. KM, Grisolia. C , Pieczarka. JC, de Souza. L, De Souza Filho. J y Nagamachi. C, (2014). FISH in micronucleus test demonstrates aneugenic action of rotenone in a common freshwater fish species, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mutagenesis* : 1–5pp.
- Mewes .D, Spiel Vogel.S y Winkelmann.C (2017). RNA/DNA ratio as a growth indicator of stream periphyton. *Freshwater Biology* . 62: 807–818.
- McIntyre. S; Heard. KM y Marting. TG (2003). The relative importance of cattle grazing in subtropical grasslands: does it reduce or enhance plant biodiversity? *J. Appl. Ecol.* 40:445-457pp.
- Minissi. S, Ciccotti. E y Rizzoni.M (1996). Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebeius* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. *Mutation Research* 367 (4):245-251.
- Miracle. AL y Ankley. G (2005).Ecotoxigenomics: Linkages between exposure effects in assessing risks of aquatic contaminants to fish. *Reprod Toxicol* 19:321-326.
- Mise .FT, Message. HJ, Pagotto João.PA y Goulart. E (2018). Environmental assessment in tropical streams by using abundance-biomass curves and W index in fish assemblages. *Iheringia, Sér. Zool.* 108, e2018029

- Montenegro. D y Gonzalez. MT (2012).Evaluation of somatic indexes, hematology and liver histopathology of the fish *Labrisomus philippii* from San Jorge Bay, northern Chile, as associated with environmental stress. *Rev. biol. mar. oceanogr*; 47(1), 99-107pp.
- Morgan M J y Lilly G R (2006). The impact of condition on reproduction in flemish Cap cod. *J Northw Atl Fish Sci*. 37: 81-86pp.
- Moss.B (2008). Water pollution by agriculture, *Philos. T. R. Soc. B*, 363, 659–666,
- Mudry .M y Carballo. M (2006). *Genética Toxicologica*. 1ra. Edición, Editorial Buenos Aires: 220-230
- Murry. B y Farrell. JM (2014). Resistance of the size structure of the fish community to ecological perturbations in a large river ecosystem. *Freshwater Biology* . 59, 155–167.-
- Nimet. J, de Arruda Amorim. JP y Delariva. RL (2018). Histopathological alterations in *Astyanax bifasciatus*(Teleostei: Characidae) correlated with land uses of surroundings of streamsNeotropical Ichthyology, 16(1): e170129. DOI: 10.1590/1982-0224-20170129.
- Novak. M y Wootton. JT (2008). Estimating nonlinear interaction strengths: an observation-based method for species-rich food webs. *Ecology*, 89: 2083-2089.
- Nowlin. W H, Drenner. RW, Guckenberger. KR, Lauden.MA, Alonso. GT, Fennel. JE y Smith. JL (2006). Gape limitation, prey size refuges and the top-down impacts of piscivorous largemouth bass in shallow pond ecosystems. *Hydrobiologia*, 563: 357-369pp.
- Obe.G, Pfeiffer. P,Savage .JRK, Johannes .C, Goedecke. W y Jeppesen.P(2002). Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutat Res* 504:17-36.
- Ohe. T, Watanabe .T y Wakabayashi .K (2004). Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research*, vol. 567, p. 109-149. PMid:15572284.
- O’Callaghan.YC, Woods. JA y O’Brien. NM (2001). Limitations of the single-cell gel electrophoresis assay to monitor apoptosis in U937 and HepG2 cells exposed to 7beta-hydroxycholesterol. *Biochem Pharmacol* ,61:1217–1226.
- Oliva. M, Vicente. JJ, Gravato. C, Guilhermino. L y Galindo-Riaño. MD (2012). Oxidative stress biomarkers in Senegal sole, *Solea senegalensis*, to assess the impact of heavy metal pollution in a Huelva estuary (SW Spain): seasonal and spatial variation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 75, 151–162.
- Olive. PL, Wlodek .D y Banath .JP (1991). DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Res*. 51:4671–4676.
- Olive PL,y Durand RE (2005). Heterogeneity in DNA Damage using the Comet Assay. *Cytometry Part A*. 66A(1):1–8pp.
- Pacheco.JP, Arocena. R, Chalar. G , García. P, Gonzalez-Piana. M, Fabián. D , Olivero. V y Silva. M (2012). Evaluación del estado trófico de arroyos de la cuenca de Paso Severino (Florida, Uruguay) mediante la utilización del índice biótico TSI-BI. *AUGMDOMUS*. Volumen 4. 80-91pp.
- Palhares. D y Grisolia.CD (2002). Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. *Genet Mol Biol* 25:281-284
- Peck. MA, Buckley. LJ,Caldarone. EM y Bengtson. DA (2003).Effects of food consumption and temperature on growth rate and biochemical-based indicators of growth in early juvenile Atlantic cod

Gadus morhua and haddock *Melanogrammus aeglefinus*. Marine Ecology Progress Series, 251, 233–243pp.

-Peckarsky. BL (1983). Biotic interactions or abiotic limitations? A model of lotic community structure. In: Fontaine TD III, Bartell SM (eds) Dynamics of Lotic Ecosystems. Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI, pp 303–323

-Pérez-Parada. A, Goyenola. G, Teixeira de Mello. F y Heinzen. H (2018). Recent advances and open questions around pesticide dynamics and effects on freshwater fishes. Current Opinion in Environmental Science & Health, n 4;38–44pp.

-Pepin. P, Evans .GT y Shears. TH (1999). Patterns of RNA/DNA ratios in larval fish and their relationship to survival in the field. ICES J. Mar. Sci 1999, 56, 697–706

-Perevolotsky. A y Seligman. NG (1998). Role of grazing in Mediterranean rangeland ecosystems. BioScience 48:1007-1017pp.

-Peterson .MJ, Efroymsen.RA y Adams SM. (2011). Long-term biological monitoring of an impaired stream: synthesis and environmental management implications. Environ Manage.47(6):1125-1140pp.

-Phelan. BA, Goldberg. R, Bejda. AJ, Pereira. J, Hagan. S, Clark. P, Studholme. AL, Calabrese.A y Able. KW(2000). Estuarine and habitat-related differences in growth rates of young-of-theyear winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and tautog (*Tautoga onitis*) in three northeastern US estuaries. J. Exp. Mar.Biol. Ecol. 247, 1 – 28.

-Pielou. EC (1969). An introduction to mathematical ecology. Wiley-interscience john wiley & sons, 285 p.

-Pinto. BCT; Peixoto. MG y Araújo. FG (2006). Effects of the proximity from an industrial plant on fish assemblages in the rio Paraíba do Sul, southeastern Brazil. Neotropical Ichthyology 4(2):269-278.

-Poole. GC (2002). Fluvial landscape ecology: addressing uniqueness within the river discontinuum. Freshwater Biology, 47: 641-660.

-Porter.CM y Janz. D (2003). Treated municipal sewage discharge affects multiple levels of biological organization in fish. Volume 54, Issue 2, February 2003, Pages 199-206

-Price. WH (1952). Phage formation in *Staphylococcus muscae* cultures. XI. The synthesis of ribonucleic acid, desoxyribonucleic acid, and protein in uninfected bacteria. Journal of General Physiology, 35, 741–759.

-Pusey. BJ y Arthington.AH (2003). Importance of the riparian zone to the conservation and management of freshwater fish: a review. Marine and Freshwater Research, 54: 1-16

-Pustiglione Marinsek. G, Abessa. D, Gusso Choueri. P , Choueri. R, Nascimento Gonçalves. A, D'angelo Barroso.V , Santos. G, Cestari. MM, Galvão de Campos. B y Mari. R (2018). Enteric nervous system analyses: New biomarkers for environmental quality assessment. Marine Pollution Bulletin. 137. 711-722pp.

-Quintans. F, Scasso. F, Loureiro. M y Yafe. A (2009). Diet of *Cnesterodon decemmaculatus* (Poeciliidae) and *Jenynsia multidentata* (Anablepidae) in a hypertrophic shallow lake of Uruguay. Iheringia, Sér. Zool., Porto Alegre, 99(1):99-105pp.

- Ramsdorf. W, Guimaraes. F, Ferraro. M, Gabardo. J, Silva Trindade. E y Cestari. MM (2009). Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. *Mutation Research* 673 (2009) 78–81
- Ramsdorf. WA, Vicari. T, De Almeida. MIN, Ferreira Arttoni. R y Cestari. MM (2012). Handling of *Astyanax sp.* for biomonitoring in Cangüiri Farm within a fountainhead (Iraí River Environment Preservation Area) through the use of genetic biomarkers. *Environmental Monitoring and Assessment*. 184, 5841-5849pp. PMID:22821320. <http://dx.doi.org/10.1007/s10661-012-2752-4>
- Revenga. C y Kura .Y (2003). Status and trends of biodiversity of inland water ecosystems. Technical Series No. 11. Secretary of the Convention on Biological Diversity, Montreal
- Ricker, W. E., 1973: Linear regressions in fishery research. *Fish. Res. Board Can.* 30, 409–434pp.
- Ricklefs. RE y Miller. GL (1999). *Ecology* fourth edition. Newton, Mass. : Chiron Press 861 pp
- Richter, T.J. (2007). Development and evaluation of standard weight equations for bridgelip sucker and largescale suckers. *North American Journal of Fisheries Management*, 27: 936-939.
- Richards. C, Johnson .LB y Host. GE (1996). Landscap escale influences on stream habitats and biota. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53: 295–311.
- Rörig, LR., Tundisi, JG., Schettini, CAF., Pereira-Filho, J., Menezes, JT., Almeida, TCM., Urban, SR., Radetski, CM., Sperb, RC., Stramosk, CA., Macedo, RS., Castro-Silva, MA., y Perez, JAA. (2007). From a water resource to a point pollution source: the daily journey of a coastal urban stream. *Brazilian Journal of Biology*, 67(4), 597-609.
- Rocha CAM, Santos R, Bahia MO, Cunha LA, Ribeiro H y Burbano R (2009) The micronucleus assay in fish species as an important tool for xenobiotic exposure risk assessment - A brief review and an example using neotropical fish exposed to methylmercury. *Rev Fish Sci* 17:478-484.
- Rodriguez. C, Gall. O, Olsson. D, Tellechea. JS y Norbis. W (2017). Length- weight relationships and condition factor of eight fish species inhabiting the Rocha Lagoon, Uruguay. *Brazilian Journal of Oceanography*. Vol 65(1):83-86pp.
- Rodríguez-Gallego. L, Achkar. M, Defeo.O,Vidal. L, Meerhoff .E y Conde.D (2017). Effects of land use changes on eutrophication indicators in five coastal lagoons of the Southwestern Atlantic Ocean, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*.doi: 10.1016/j.ecss.2017.02.010.
- Romeo. M, Siau. Y, Sidoumou. Z y Gnassia-Barelli. M (1999). Heavy metal distribution in different fish species from the Mauritania coast. *Sci Total Environ* 232:169–175pp.
- Ryding. SO y Rast.W (1992). *El control de la eutrofización en lagos y pantanos*. Ediciones Pirámide, Madrid.
- Rypel. AL y Richter. TJ (2008). Empirical percentile standard weight equation for the Blacktail Redhorse. *North American Journal of Fisheries Management*, 28: 1843-1846pp.
- Sadekarpawar. S y Parikh. P (2013). Gonadosomatic and Hepatosomatic Indices of Freshwater Fish *Oreochromis mossambicus* in Response to a Plant Nutrient. *World Journal of Zoology* 8 (1): 110-118pp
- Sakamoto. KQ, Nakai. K, Aoto. T, Yokoyama. A, Ushikoshi. R, Hirose. H, Ishizuka. M, Kazuska. A y Fujita. S (2003). Cytochrome P450 induction and gonadal status alteration in common carp (*Cyprinus*

- carpio*) associated with the discharge of dioxin contaminated effluent to the Hikiji River, Kanagawa Prefecture, Japan. *Chemosphere*, vol. 51, no. 6, 491-500pp
- Santos. FB; Ferreira. FC y Esteves. K E (2015). Assessing the importance of the riparian zone for stream fish communities in a sugarcane dominated landscape (Piracicaba River Basin, Southeast Brazil). *Environmental Biology of Fishes* 98:1895-1912pp.
- Sá-Oliveira. JC; Isaac. V J y Ferrari. S F (2015). Fish community structure as an indicator of the long-term effects of the damming of an amazonian river. *Environmental Biology of Fishes* 98:273-286pp.
- Schneider. KN y Winemiller.KO (2008). Structural complexity of woody debris patches influences fish and macroinvertebrate species richness in a temperate floodplain-river system. *Hydrobiologia*, 610: 235-244.
- Sayeed. I, Parvez. S, Pandey. S, Bin-Hafeez. B, Haque. R y Raisuddin. S(2003). Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56 (2), 295–301. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00009-5](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00009-5)
- Scarpato. R, Migliore. L, Alfinito-Cognetti. G y Barale. R(1990). Induction of micronuclei in grill tissue of *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted marine waters. *Marine Pollution Bulletin*. Vol 21(2): 74-80
- Schindelin. J, Arganda-Carreras. I y Frise. E et al. (2012). "Fiji: an open-source platform for biological-imageanalysis", *Naturemethods* 9(7):676-682, PMID22743772, doi:10.1038/nmeth.2019
- Seriani. R, Tavares Ranzani-Paiva. MJ, Silva-Souza. A y Napoleão. S (2011). Hematology, micronuclei and nuclear abnormalities in fishes from São Francisco river, Minas Gerais state, Brazil. *Acta Scientiarum, Biological Science, Maringá*, 33(1) 107-112 pp. - doi: 10.4025/actasciobiolsci.v33i1.7117
- Serra. S, Bessonart. J , Teixeira de Mello. F, Duarte. A, Malabarba. L y loureiro. M (2014). *Peces del Río Negro*. Montevideo MGAP-DINARA, 208p.
- Schmitz. OJ (1992). Exploitation in model food chains with mechanistic consumer-resource dynamics. *Theoretical Population Biology*, 41: 161-183
- Shannon. CE y Wiener. W (1949). *The mathematical theory of communication*. University illinois press, urbana, il.
- Sharpley. AN, Chapra. SC, Wedepohl. R, Sims. JT, Daniel. TC y Reddy. KR (1994). Managing agricultural phosphorus for protection of surface waters: issues and options, *J. Environ. Qual.*, 23, 437–451pp.
- Siddig. AH, Ellison. AM, Ochs. A, Villar-Leemand. C y Laub. K (2016). How do ecologists select and use indicator species to monitor ecological change? Insights from 14 years of publication in *Ecological Indicators*. *Ecological Indicators* 60 (2016) 223–230
- Silva .VSS, Dias .AH, Dutra. ES, Pavanin .AL, Morelli .S y Pereira. BB (2015). The impact of water pollution on fsh species in southeast region of Goiás, Brazil. *J Tox Environ Health* 79(1):8–16.
- Silva.YJAB, Cantalice.JRB, Nascimento. CWA, Singh .VP, Silva .YJAB, Silva. CM, Silva Mo y Guerra. SMS (2017). Bedload as an indicator of heavy metal contamination in a Brazilian anthropized watershed.*CATENA* 153(2):106–113.
- Simonato JD, Mela M, Doria HB, Guiloski IC, Carvalho PS, Meletti PC, Silva de Assis HC, Bianchini A, Martinez CB (2016) Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fsh *Prochilodus lineatus*.*Aquat Toxicol.* 170(1):31–41.

- Singh. NP, McCoy. MT, Tice. RR y Schneider. E (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175:184-91
- Singh. NP (2000). Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutation Research Journal*. 455, pag 111-127pp.
- Skinner. JA, Lewis. KA, Bardon. KS, Tucker. P, Catt, JA y Chambers. BJ (1997). An overview of the environmental impact of agriculture in the U.K. *Journal of Environmental Management* 50: 111–128pp.
- Smith. BB (2004). Carp (*Cyprinus carpio* L.) spawning dynamics and early growth in the lower River Murray, South Australia. CRC for Freshwater Ecology. School of Earth and Environmental Sciences. The University of Adelaide. 167 pp.
- SIT-MVOTMA: <http://sit.mvotma.gub.uy/websdatos/cobertura.html>
- Solé. M, Antó. M, Baena. M, Carrasson. M, Cartes. JE y Maynou. F (2010). Hepatic biomarkers of xenobiotic metabolism in eighteen marine fish from NW Mediterranean shelf and slope waters in relation to some of their biological and ecological variables. *Marine Environmental Research*. 70, 2, pp. 181-188pp. PMID:20494437.
- Sotil. G, Alvis. R, Francia. JC y Shiga. B (2007). Application of two biomarkers for analysis of DNA lesions on marina bivalves. *Rev. Peru. Biol.* Vol 13(3): 249-253.
- Speit .G y Hartmann. A (2005). The Comet Assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. In: Keohavong, P; Grant, SG (Eds). *Methods in molecular Biology* . Vol 291, Molecular Toxicology Protocols, Human Press Inc, Totowa, NJ, 85-95pp.
- Strahler. AN .(1964). Quantitative geomorphology of drainage basins and channel networks. In Chow, V.T. (ed.) *Handbook of Applied Hydrology*, McGraw-Hill, New York. pp 439-476.
- Steedman. R J (1988). Modification and assessment of an index of biotic integrity to quantify stream quality in southern Ontario. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45: 492–501.
- Strictar- Pereira. L, Agostinho. AA y Delariva. RL (2016). Effects of river damming in Neotropical piscivorous and omnivorous fish: feeding, body condition and abundances *Neotropical Ichthyology*, 14(1): e150044.
- Tabet .M, Abda. A, Benouareth. DE, Liman. R, Konuk .M, Khallef. M, Taher. A (2015) .Mutagenic and genotoxic effects of Guelma's urban wastewater, Algeria. *Environ Monit Assess* 187(2):13–26.
- Taylor. LR (1961). Aggregation, variance, and the mean. *Nature* 189: 732-735pp.
- Teixeira de Mello. F (2007). Efecto del uso del suelo sobre la calidad del agua y las comunidades de peces en sistemas lóticos de la cuenca baja del río Santa Lucía (Uruguay). Tesis de Maestría. Universidad de la República (Uruguay), Facultad de Ciencias.
- Teixeira-de Mello. F, Meerhoff. M, Pekcan-Hekim. Z y Jeppesen. E (2009). Substantial differences in littoral fish community structure and dynamics in subtropical and temperate shallow lakes. *Freshwater Biology* 54: 1202– 1215pp.
- Teixeira de Mello. F; González-Bergonzoni. I y Loureiro. M (2011). Peces de agua dulce del Uruguay. PPR-MGAP. 188 pp

- Teixeira de Mello. F, Meerhoff. M, Baattrup-Pedersen.A, Maigaard. T, Kristensen.PB, Andersen.TK, Clemente.JM, Fosalba.C, Kristensen.EA, Masdeu.M, Riis.T, Mazzeo.N y Jeppesen.E (2012). Community structure of fish in lowland streams differ substantially between subtropical and temperate climates . *Hydrobiologia* (2012) 684:143–160pp.DOI 10.1007/s10750-011-0979-7
- Teixeira de Mello. F, Kristensen. EA, Meerhoff. M,González-Bergonzoni. I, Baattrup-Pedersen. A, Iglesias. C, Kristensen. PB,Mazzeo. N y Jeppesen. E (2014).Monitoring fish communities in wade able lowland streams: comparing the efficiency of electrofishing methods at contrasting fish assemblages. *Environ Monit Assess.*186 (3): 1665-77.
- Teixeira-de Mello. F, Meerhoff. M, González-Bergonzoni. I, Kristensen. EA, Baattrup-Pedersen. A y Jeppesen. E (2015). Influence of riparian forests on fish assemblages in temperate lowland streams. *Environmental Biology of Fishes*, 99(1): 133-144.
- Thompson. RM, Dunne. J y Woodward. G (2012). Freshwater food webs: towards a more fundamental understanding of biodiversity and community dynamics. *Freshwater Biology* , Special review .
- Tice .RR, Agurell. E, Anderson. D, Burlinson. B, Hartmann. A, Kobayashi. H, Miyamae. Y, Rojas. E, Ryu. JC y Sasaki .YF. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* **35**, 206 – 221pp.
- Tilman, D., Knops, J., Wedin, D., Reich, P., Ritchie, M.y Siemann, E. (1997). The influence of functional diversity and composition on ecosystem processes. *Science* 277: 1300-1302pp.
- Toft,G , Edwards. T ,Baatrup. E y Guillette, LJ Jr (2003). Disturbed Sexual Characteristics in Male Mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) from a Lake Contaminated with Endocrine Disruptors. *Environmental Health Perspectives*, 111;5.
- Toft .G, Baatrup. E y Guillette LJ Jr(2004). Altered social behavior and sexual characteristics in mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) living downstream of a paper mill. *Aquat Toxicol.* 10;70(3):213-22.
- Torres-Bugarín. O, Zavala-Aguirre. JL, Gómez-Rubio. P, Buelna-Osben. H ,Zúñiga-González. G y García-Ulloa Gómez. M (2007). Potential fish species as genotoxicity biomarkers at lake “La Alberca”, Michoacan, Mexico. *Hidrobiológica* 2007, 17 (1): 75-81
- Troncoso IC, Cazenave J, Bacchetta C y Bistoni .MA (2012). Histopathological changes in the gills and liver of *Prochilodus lineatus* from the Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Fish Physiol Biochem* [serial on the internet]. 2012; 38(3):693- 702.
- Valderrama. JC (1981). The simultaneous analysis of total N and total P in natural waters. *En: Mar. Chem .*, 10, pp.1009-1022.
- Valesini. FJ, Cottingham. A, Hallett. CS y Clarke. KR (2017). Interdecadal changes in the community, population and individual levels of the fish fauna of an extensively modified estuary. *J Fish Biol.*(5):1734-1767pp. doi: 10.1111/jfb.13263.
- Van den Brink. PJ (2008). Ecological risk assessment: from book-keeping to chemical stress ecology. *Environ. Sci. Technol.* 42: 8999 – 9004.

- Van den Heuvel. M y Ellis. R.J (2009). Timing of exposure to a pulp and paper effluent influences the manifestation of reproductive effects in rainbow trout. *Environmental toxicology and chemistry* Vol 21: 11. Pages 2338-2347
- Van der Oost .R, Beyer. J y Vermeulen. NPE (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **13**, 57 – 149.
- Viana. LF,Rondon Suárez.Y, Lima Cardoso.C, Amaral Crispim.B, de Carvalho Cavalcante. D, Barufatti Grisolia. A y Lima-Junior. S (2018). The Response of Neotropical Fish Species (Brazil). on the Water Pollution: Metal Bioaccumulation and Genotoxicity. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* . 75:476–485
- Vidal. N, Zaldúa. N, D’Anatro. A y Naya. DE (2014). Are the most plastic species the most abundant ones? an assessment using a fish assemblage. *PLoS ONE* 9: e92446.
- Vidal. N, Loureiro. M, Hued. AC, Eguren.G y Teixeira de Mello. F (2018). Female masculinization and reproductive success in *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Cyprinodontiforme: Poeciliidae) under anthropogenic impact. *Ecotoxicology* .
- Villamarín .F, Magnusson. W , Jardine. T, Valdez. D, Woods. R y Bunn. S (2016). Temporal Uncoupling between Energy Acquisition and Allocation to Reproduction in a Herbivorous-Detritivorous Fish. *Plos One*, 11(3): e0150082
- Villar. S, Marquez. A y Gutierrez .JM (2014). Micronucleus test in fishes of the Río Uruguay usng epifluorescence. *Trends in Comparative Biochemistry & Physiology* . 18: 61-66
- Vosylienė. MZ (1999). “The Effect of Heavy Metals on Haematological Indices of Fish (Survey).” *Acta Zoologica Lituanica* 9 (2): 76–82.
- Wang. WX (2002). Interactions of trace metals and different marine food chains. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 243: 295-309.
- Warry.FY, Reich. P , Cook.PLM, Mac Nally. R y Woodland. RJ (2018). The role of catchment land use and tidal exchange in structuring estuarine fish assemblages. *Hydrobiologia* (2018) 811:173–191
- Warton. DI, Wright. IJ, Falster. DS y Westoby. M (2006). Bivariate line-fitting methods for allometry. *Biological Reviews* 81:259-291.
- Warwick. RM (1986). A new method for detecting pollution effects on marine macrobenthic communities. *Marine Biology*, 92, 557-562.
- Warwick. RM y Clarke. KR (1994). Relearning the ABC: taxonomic changes and abundance/biomass relationship in disturbed benthic communities. *Marine Biology* 118:739-744.
- Weisbrod. A ,Burkhard. L ,Arnot. J, Mekenyan. O ,Howard. P, Russom. C , Boethling. R, Sakuratani. Y, Traas. T, Bridges. T, Lutz. C, Bonnell. M , Woodburn. K y Parkerton. T (2007). Workgroup Report: Review of Fish Bioaccumulation Databases Used to Identify Persistent, Bioaccumulative, Toxic Substances. *Environmental Health Perspectives* : 115, 2.
- Wilkins. RC, Kutzner. BC, Truong. M, Sanchez-Dardon. J y McLean. JR (2002). Analysis of radiation-induced apoptosis in human lymphocytes: flow cytometry using Annexin V and propidium iodide versus the neutral comet assay. *Cytometry* ,48:14–19pp.

- Wilson. JG, McHugh. B y Giltrap. M (2014). Biomarkers: are realism and control mutually exclusive in integrated pollution assessment? *Send to Mar Environ Res.* 102:11-7. doi: 10.1016/j.
- Wilson .JG, Giltrap .M y Kelly.F (2016).Fish in Tidal Freshwater Transitional Waters in Ireland: recommendations for assessment, policy and management of ecological quality under the Water Framework Directive (WFD). *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy.* DOI: 10.3318/BIOE.2016.28
- Williams LM y Oleksiak MF. (2011). Ecologically and evolutionarily important SNPs identified in natural populations. *Mol. Biol. Evol.* 28, 1817–1826
- Witeska. M (2013).Erythrocytes in teleost fishes: a review, *Zoology and Ecology*, DOI: 10.1080/21658005.2013.846963
- Wootton. R J (1990). *Ecology of Teleost Fishes.* I. Chapman and Hall, New York, NY.
- Wo. K, Lam. P y Wu. R (1999). A comparison of growth biomarkers for assessing sublethal effects of cadmium on a marine gastropod *Nassarius festivus*. *Mar. Pollut. Bull.* 39: 165-173
- Yaffe. A, Loureiro. M, Scasso. F y Quintans. F (2002). Feeding of two Cichlidae species (Perciformes) in an hypertrophic urban lake. *Iheringia, Ser. Zool, Porto Alegre.* 92 (4): 73-79pp.
- Yates. A y Bailey .RC (2011). Effects of taxonomic group, spatial scale and descriptor on the relationship between human activity and stream biota. *Ecological Indicators* ;11(3), 759-771pp
- Yemane. D, Field. JG y Leslie RW (2005). Exploring the effects of fishing on fish assemblages using Abundance Biomass Comparison (ABC) curves. *ICES Journal of Marine Science* 62: 374-379pp. <https://doi.org/10.1016/j.icesjms.2005.01.009>
- Zaldívar. JM, Cardoso. AC, Viaroli. P, Newton. A, de Wit. R, Ibanez. C, Reizopoulou. S, Somma. F, Razinkovas. A, Basset. A, Holmer. M y Murray. N (2008). Eutrophication in transitional waters: an overview. *Transitional Waters Monogr.* 1, 1e78
- Zar. JH (2010). *Biostatistical Analysis.* Quinta edición. Pearson Prentice Hall, New Jersey.
- Zarucki. M, González-Bergonzoni. I ,Teixeira-de Mello. F y Loureiro. M (2011). Fish diversity loss in an urban stream o Uruguay throughout the last century. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* ; v 6(1):71-75pp.
- Zurrita. AA, M.H. Badii, A. Guillen, O. Lugo Serrato y J.J. Aguilar Garnica (2015). Factors Causing Environmental Degradation. *Daena: International Journal of Good Conscience.* 10(3)1-9.